فهرست مطالب

فصل اول

مقدمه ۱۵

سابقه تاریخی... ۱۵

مزیت های کشت بافت ۱۸

کنترل محیط ۱۸

تعیین هویت و همگنی نمونه................................ ۲۰

صرفه جویی، مقیاس و مکانیزه کردن ۲۰

الگو سازی *in vitro* از شرایط *in vivo* ۲۰

محدودیت ها ۲۰

مهارت... ۲۰

کمیت.. ۲۰

تمایز زدایی و انتخاب.. ۲۰

منشاء سلول ها.. ۲۱

ناپایداری ۲۱

تفاوت های عمده در *in vitro* ۲۱

انواع کشت بافت ۲۱

فصل دوم

بیولوژی سلولهای کشت یافته............... ۲۵

شرایط محیطی کشت ۲۵

اتصال سلولی ۲۵

ملکول‌های اتصال سلولی ۲۵

اسکلت سلولی ۲۷

جنبش سلولی.. ۲۷

تکثیر سلولی... ۲۸

چرخه سلولی ۲۸

کنترل تکثیر سلولی ۲۸

تمایز ۲۸

حفظ تمایز ۲۹

شروع کشت... ۲۹

تکامل رده‌های سلولی ۲۹

پیرشدگی... ۳۱

تکامل رده‌های سلولی پیوسته.......................... ۳۱

منشاء سلول‌های کشت یافته ۳۳

فصل سوم

تجهیزات ۳۵

نیازهای یک آزمایشگاه کشت بافت............. ۳۵

ناحیه آسپتیک... ۳۵

هود لامینار فلو.. ۳۵

سیلندرهای پی پت.. ۳۷

پمپ تخلیه.. ۳۷

گاریهای سرویس ۳۸

میکروسکوپ معکوس ۳۸

سانتریفوژ ۳۹
جابه جایی مایعات به صورت استریل- پی پتینگ و توزیع کردن ۳۹
پی پت یار ۳۹
سمپلرها ۴۰
اتوماسیون ۴۰
دستگاه سلول شمار ۴۰
دوربین CCD و مانیتور ۴۱
میکروسکوپ تشریح ۴۱
انکوباسیون ۴۱
انکوباتور ۴۱
انکوباتور CO_2 مرطوب ۴۱
دستگاه ثبت درجه حرارت ۴۲
رک های غلتان ۴۲
ذخیره سازی ۴۲
یخچال و فریزر ۴۲
محفظه های مخصوص ذخیره سازی در سرما ۴۲
فریزرهای قابل کنترل ۴۳
فریزرهای با درجه حرارت پایین ۴۳

فصل چهارم

تکنیک آسپتیک ۴۵
اهداف تکنیک آسپتیک ۴۵
حفظ استریلیتی ۴۵
ارکان محیط آسپتیک ۴۵
محیط آرام ۴۵
سطح کار ۴۶
بهداشت شخصی ۴۶
معرف‌ها و محیط‌های کشت ۴۶
کشت‌ها ۴۶
کارکردن استریل ۴۶
سواب کردن ۴۶
درپوش گذاری ۴۸
شعله دهی ۴۸
کار کردن با بطری‌ها و فلاسک ها ۴۹
پی‌پت کردن ۴۹
جریان لامینار ۵۰
انکوباتورها ۵۰
کشت‌های بسته بندی شده ۵۱
گاز دهی با CO_2 ۵۱

فصل پنجم

ظروف کشت و بسترها ۵۳
بستر ۵۳
اتصال و رشد ۵۳
مواد بستر ۵۳
انتخاب ظروف کشت ۵۴
محصول سلولی ۵۴
کشت‌های سوسپانسیون ۵۴
تهویه کردن ۵۶
نمونه‌برداری و تجزیه و تحلیل ۵۶
رشد غیر یکنواخت ۵۷
سطوح تیمار شده ۵۸
لایه‌های تغذیه کننده ۵۸
قالب‌های سه بعدی ۵۸
بسترهای فلزی ۵۸
بسترهای غیرچسبنده ۵۹

فصل ششم

محیط‌های کشت تعریف شده و مکمل‌ها ۶۱
تکامل محیط‌های کشت ۶۱
خواص فیزیکوشیمیایی ۶۱
دستور کار ۱-۶- تهیه استانداردهای pH ۶۱
CO_2 و بیکربنات ۶۲
بافرینگ ۶۳
اکسیژن ۶۳
اسمولالیته ۶۴
درجه حرارت ۶۴
ویسکوزیته ۶۵
فشار سطحی و تولید کف ۶۵
محلول‌های نمکی متعادل ۶۵
محیط‌های کشت کامل ۶۵
اسیدهای آمینه ۶۶
ویتامین‌ها ۶۶
نمک‌ها ۶۷

گلوکز... ۶۷
مکمل‌های آلی ۶۷
هورمون‌ها و فاکتورهای رشد ۶۷
آنتی بیوتیک‌ها ۶۷
سرم ۷۰
پروتئین ۷۰
فاکتورهای رشد... ۷۰
هورمون‌ها ۷۰
مواد مغذی و متابولیت‌ها ۷۰
لیپیدها ۷۱
مواد معدنی ۷۱
بازدارنده‌ها ۷۱
انتخاب محیط کشت و سرم ۷۱
ذخیره بچ... ۷۳
آزمایش سرم ۷۳
کارایی پلیتینگ... ۷۳
منحنی رشد ۷۳
حفاظت ازخصوصیات کشت سلولی.. ۷۳
استریلیتی... ۷۴
غیر فعال سازی حرارتی ۷۴
مکمل‌های دیگر ۷۴
هیدرولیزات‌های اسید آمینه.. ۷۴
عصاره جنین ۷۴
محیط کشت شرطی... ۷۴

فصل هفتم

محیط‌های کشت بدون سرم ۷۷
مزیت‌های محیط های کشت بدون سرم......... ۸۲
معایب کشت‌های فاقد سرم ۸۲
جایگزینی سرم ۸۲
واکشت بدون سرم ۸۲
هورمون‌ها ۸۳
فاکتورهای رشد ۸۳
مواد مغذی سرم ۸۷
پروتئین‌ها و پلی‌آمین‌ها ۸۷
ماتریکس.. ۸۷
انتخاب محیط کشت بدون سرم ۸۷
محیط‌های کشت بدون سرم تجاری موجود ۸۷
جایگزین‌های سرم ۸۸
سازگاری به محیط کشت بدون سرم ۸۸
تکامل محیط‌های کشت بدون سرم ۸۸
آماده سازی محیط کشت بدون سرم ۹۱
محیط‌های کشت فاقد پروتئین ۹۱
نتیجه ۹۱

فصل هشتم

آماده سازی و استریلیزاسیون............. ۹۳
آماده سازی معرفها و مواد ۹۳
وسایل ۹۳
شیشه آلات ۹۳
دستور کار۱-۸ - آماده سازی و استریل کردن ظروف شیشه‌ای.......................... ۹۴
پی‌پت‌های شیشه‌ای... ۹۵
دستورکار۲-۸ - آماده سازی و استریل کردن پی‌پت‌ها.. ۹۵
درپوش‌های پیچی ۹۸
دستور کار۳-۸-آماده سازی و استریلیزاسیون درپوش های پیچی ۱۰۰
درپوش‌های پلی پروپیلن ۱۰۰
انتخاب دترژنت ۱۰۰
استریلیزاسیون ۱۰۰
روشهای استریلیزاسیون دیگر.. ۱۰۱
معرف‌ها و محیط‌های کشت...................... ۱۰۱
آب ۱۰۱
محلولهای متعادل نمکی.. ۱۰۱
دستور کار ۴-۸- تهیه و استریلیزاسیون D-PBSA ۱۰۱
تهیه و استریلیزاسیون محیط‌های کشت ۱۰۲
دستور کار۵-۸- آماده سازی محیط کشت از استوک ×۱ .... ۱۰۲
دستور کار ۶-۸- تهیه محیط کشت از محلول غلیظ ×۱۰ .... ۱۰۳
محیط‌های کشت پودری ۱۰۵
دستور کار۷-۸ - تهیه محیط کشت از پودر۱۰۵
محیط کشت سفارشی.. ۱۰۶
دستور کار۸-۸- تهیه محیط کشت سفارشی.... .... ۱۰۶

استریلیزاسیون محیط‌های کشت............ ۱۰۶
محیط‌های کشت قابل اتوکلاو ۱۰۷
فیلتراسیون استریل ۱۰۷
دستور کار۹-۸- فیلتراسیون استریل با فیلتر سرسرنگی ۱۰۷
دستور کار۱۰-۸- فیلتراسیون استریل با فلاسک فیلتردار ۱۰۷
ذخیره سازی ۱۰۸

فصل نهم

کشت اولیه ۱۱۱
انواع کشت های سلولی اولیه............ ۱۱۱
جداسازی بافت..................................... ۱۱۲
جنین موش ۱۱۲
دستور کار ۱-۹- جداسازی جنین های موش ۱۱۲
جنین جوجه....................................... ۱۱۳
دستور کار۲-۹- جداسازی جنین های جوجه ۱۱۴
مواد بیوپسی انسان ۱۱۵
دستور کار۳-۹- بیوپسی های انسان ۱۱۵
کشت اولیه ۱۱۹
اکسپلنت اولیه ۱۱۹
دستور کار۴-۹- اکسپلنت اولیه ۱۱۹
تفکیک آنزیمی.................................... ۱۲۱
تریپسین گرم...................................... ۱۲۳
دستور کار۵-۹ - تفکیک بافت در تریپسین گرم ۱۲۳
تریپسینه کردن با پیش تیمار سرد.......... ۱۲۶
دستور کار ۶-۹- تفکیک بافت در تریپسین ۱۲۶
روش های آنزیمی دیگر ۱۲۷
کلاژناز... ۱۲۸
دستور کار ۷-۹- تفکیک بافت در کلاژناز.. ۱۲۸
تفکیک مکانیکی.................................. ۱۳۰
دستور کار۸-۹- تفکیک مکانیکی با الک کردن... .... ۱۳۰
جداسازی سلول های زنده و غیر زنده.......... ۱۳۳
دستور کار۹-۹- غنی سازی سلول های زنده... .... ۱۳۴
خلاصه کشت اولیه ۱۳۶
گزارش های اولیه ۱۳۶

فصل دهم

واکشت و رده‌های سلولی............ ۱۳۹
واکشت و تکثیر.................................... ۱۳۹
اصطلاحات.. ۱۳۹
سن کشت ۱۴۱
معرفی رده سلولی ۱۴۴
انتخاب رده سلولی.............................. ۱۴۴
نگهداری روزمره................................. ۱۴۵
اهمیت مورفولوژی سلولی ۱۴۵
تعویض محیط کشت ۱۴۵
دستور کار۱-۱۰- غذادهی یک کشت تک لایه ۱۴۶
واکشت ۱۴۷
معیارهای واکشت ۱۴۷
دستور کار۲-۱۰- واکشت سلولهای تک لایه..... .... ۱۴۸
چرخه رشد و نسبت‌های تقسیم ۱۵۱
غلظت سلولی در واکشت ۱۵۲
تکثیر در سوسپانسیون........................ ۱۵۲
واکشت کشت‌های سوسپانسیون............ ۱۵۳
دستور کار۳-۱۰- واکشت در سوسپانسیون...... .... ۱۵۳
استانداردسازی شرایط کشت................ ۱۵۴
استفاده از آنتی بیوتیک....................... ۱۵۵
نگهداری مدارک ۱۵۷

فصل یازدهم

آلودگی ۱۵۹
منابع آلودگی ۱۵۹
تکنیک کاربر ۱۵۹
محیط ۱۵۹
استفاده و نگهداری از هود لامینارفلو........ ۱۵۹
انکوباتورهای مرطوب........................... ۱۵۹
مخازن سرد ۱۶۰
مواد استریل...................................... ۱۶۰

رده های سلولی و بیوپسی های وارد شده........... ۱۶۰
انواع آلودگی میکروبی ۱۶۰
بررسی آلودگی ۱۶۰
آلودگی میکروبی قابل مشاهده........................ ۱۶۱
میکوپلاسماها.. ۱۶۱
اصول رنگ آمیزی فلورسنس میکوپلاسماها........ ۱۶۳
دستور کار۱-۱۱- آشکارسازی فلورسانس میکوپلاسما.. ۱۶۴
PCR برای میکوپلاسما ۱۶۵
دستور کار۲-۱۱- تشخیص میکوپلاسما با PCR.. ۱۶۵
روش‌های دیگر برای تشخیص میکوپلاسما ۱۶۸
پروتوزوآ ۱۶۸
ویروسها.. ۱۶۸
ریشه‌کنی آلودگی.................................... ۱۶۹
باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها......................... ۱۶۹
دستور کار۳-۱۱- ریشه‌کنی آلودگی میکروبی... ۱۶۹ ....
ریشه‌کنی میکوپلاسما................................ ۱۶۹
ریشه‌کنی آلودگی ویروس............................ ۱۷۰
آلودگی‌های مزمن ۱۷۰
آلودگی‌های متقاطع ۱۷۰
نتایج ۱۷۰

فصل دوازدهم

منجمد نگهداری دلیل منجمد کردن سلولها ۱۷۳
اکتساب سلولها برای منجمد نگهداری ۱۷۳
اصول منجمد نگهداری ۱۷۴
زمینه تئوری منجمد کردن سلولها.................. ۱۷۴
غلظت سلولی... ۱۷۴
محیط کشت انجماد ۱۷۴
تعادل.. ۱۷۵
میزان سرد کردن..................................... ۱۷۵
کرایو فریزر ۱۷۷
دستور کار۱-۱۲- منجمد کردن سلول ها .. ۱۷۸
پرونده های فریزر.................................... ۱۸۱
ذوب کردن آمپول های ذخیره شده ۱۸۱
دستور کار۲-۱۲- ذوب کردن سلولهای منجمد شده ۱۸۲
طراحی و کنترل استوک ها ی فریزر ۱۸۵
کنترل موجودی فریزر................................ ۱۸۵
جایگزینی سریال استوک کشت..................... ۱۸۵
بانک های سلولی ۱۸۵
انتقال دادن سلولها ۱۸۶
آمپولهای منجمد شده................................ ۱۸۶

فصل سیزدهم

تعیین کمیت.. ۱۸۷
شمارش سلولی ۱۸۷
هموسیتومتر.. ۱۸۷
هموسیتومتر دستور کار ۱-۱۳- شمارش سلولی توسط هموسیتومتر و بررسی زیستایی سلولی ۱۸۷
شمارش الکترونیکی.................................. ۱۹۰
دستور کار۲-۱۳- شمارش الکترونیکی سلولها توسط مقاومت الکتریکی.......................... ۱۹۱
تکثیر سلولی.. ۱۹۲
طراحی تجربی ۱۹۲
چرخه رشد ۱۹۲
دستور کار۳-۱۳- منحنی رشد تک لایه در فلاسک ۱۹۳
دستور کار۴-۱۳- منحنی رشد تک لایه در پلیت های چند خانه ۱۹۴
تجزیه و تحلیل منحنی های کشت تک لایه ۱۹۵
حجم محیط کشت، غلظت سلولی و دانسیته سلولی ۱۹۵
کشت های سوسپانسیون ۱۹۶
دستور کار۵-۱۳- منحنی رشد سلولهای سوسپانسیون....................................... ۱۹۷
مراحل چرخه رشد ۱۹۷
مشتقات چرخه رشد ۱۹۸
کارایی پلیتینگ..................................... ۱۹۹
دستور کار۶-۱۳- تعیین کارایی پلیتینگ.... ۲۰۰
تجزیه و تحلیل تشکیل کلنی ۲۰۲

شمارش اتوماتیک کلنی ۲۰۲
شاخص نشان دار کردن ۲۰۲
دستور کار ۷-۱۳- شاخص نشاندار کردن با [^{3}H]- تیمیدین ۲۰۲
نسبت رشد ۲۰۳
دستور کار ۸-۱۳- تعیین نسبت رشد ۲۰۴
شاخص میتوزی ۲۰۴
شاخص تقسیم ۲۰۴
زمان چرخه سلولی ۲۰۴
مهاجرت سلولی ۲۰۴

فصل چهاردهم

سیتوتوکسیسیتی ۲۰۷
زیستایی، توکسیسیتی و بقاء ۲۰۷
محدودیت های *in vitro* ۲۰۷
فارماکوکنتیک ۲۰۷
متابولیسم ۲۰۸
بافت و پاسخ های سیستمیک ۲۰۸
ماهیت سنجش ۲۰۸
زیستایی ۲۰۸
دستور کار۱-۱۴- برآورد زیستایی با استفاده از تریپان بلو ۲۰۸
دستور کار۲-۱۴- تعیین میزان زیستایی توسط جذب رنگ ۲۰۹
بقاء ۲۱۰
دستور کار ۳-۱۴ - آزمون کلونوژنیک برای سلولهای چسبنده ۲۱۰
تجزیه و تحلیل منحنی بقاء ۲۱۱
پارامترهای متغیر در آزمون بقاء ۲۱۱
سنجش های بر پایه تکثیر سلولی ۲۱۳
آزمونهای سیتوتوکسیسیتی متابولیک ۲۱۳
آزمون های میکروتیتراسیون ۲۱۴
دستور کار۴-۱۴- آزمون سیتوتوکسیسیتی براساس MTT ۲۱۴
تغییرات در آزمون MTT ۲۱۶
مقایسه میکروتیتراسیون با بقاء کلونوژنیک ۲۱۷
بر همکنش دارویی ۲۱۸
کاربردهای آزمونهای سیتوتوکسیسیتی ۲۱۸
غربالگری داروی ضد سرطان ۲۱۸
آزمایش دارویی پیشگویانه برای تومورها ۲۱۹
ترانسفورماسیون و موتانزایی ۲۱۹
آزمون موتان زایی توسط تبادل کروماتید خواهری ۲۱۹
دستور کار۵-۱۴ - تبادل کروماتید خواهری ۲۱۹
سرطانزایی ۲۲۲
التهاب ۲۲۲

فصل پانزدهم

کشت انواع سلول های اختصاصی ۲۲۳
کشت سلولی سلول های اختصاصی ۲۲۳
سلول های اپی تلیال ۲۲۳
اپیدرم ۲۲۴
دستور کار۱-۱۵- کراتینوسیت های اپیدرمی ۲۲۴
قرنیه ۲۲۷
دستور کار۲-۱۵- سلول های اپی تلیوم قرنیه ۲۲۷
سینه ۲۲۹
دستور کار۳-۱۵- اپی تلیوم پستان ۲۲۹
دهانه رحم ۲۳۰
دستور کار۴-۱۵- اپی تلیوم دهانه رحم ۲۳۰
دستگاه معده ای روده ای ۲۳۲
دستور کار۵-۱۵- جداسازی و کشت کریپت های کلون ۲۳۳
کبد ۲۳۴
دستور کار۶-۱۵- جداسازی هپاتوسیت های رت ۲۳۵
تغییرات ۲۳۶
دستور کار۷-۱۵- اپی تلیوم پانکراس ۲۳۶
کلیه ۲۳۷
دستور کار۸-۱۵- اپی تلیوم کلیه ۲۳۸
اپی تلیوم برونش و تراشه ۲۳۹
دستور کار۹-۱۵- اپی تلیوم برونش و تراشه ۲۳۹
پروستات ۲۴۰
دستور کار ۱۰-۱۵- اپی تلیوم پروستات ۲۴۰

سلول های مزانشیمی.. ۲۴۱
بافت همبند ۲۴۱
بافت چربی ۲۴۱
دستور کار۱۱-۱۵- کشت اولیه سلول های چربی.. ۲۴۲
دستور کار۱۲-۱۵- جداسازی سلول های عضله صاف.. ۲۴۳
دستور کار۱۳-۱۵- کشت میوبلاست عضله اسکلتی افراد بالغ.. ۲۴۳
دستور کار۱۴-۱۵- کشت رشته عضلانی منفرد از عضله اسکلتی.. ۲۴۵
غضروف ۲۴۶
دستور کار۱۵-۱۵- کندروسیت ها در دانه های آلژینات.. ۲۴۷
استخوان.. ۲۴۹
دستور کار۱۶-۱۵- استئوبلاست ها ۲۴۹
اندوتلیوم ۲۵۱
دستور کار۱۷-۱۵- جداسازی و کشت سلول های اندوتلیال عروقی........................ ۲۵۱
جداسازی سلول های اندوتلیال از سیاهرگ بند ناف انسان ۲۵۱
جداسازی سلول اندوتلیال آئورتی خوک........ ۲۵۳
جداسازی سلول آندوتلیال قلب موش........ ۲۵۳
جداسازی سلول های اندوتلیال قلبی انسان........ ۲۵۵
سلول های Neuroectodermal ۲۵۵
نرونها.. ۲۵۵
دستور کار۱۸-۱۵-سلول های گرانول مخچه ای ۲۵۵
سلول های گلیال ۲۵۶
دستور کار۱۹-۱۵- سلول های پوشاننده پیاز بویایی.. ۲۵۷
سلول های غدد درون ریز ۲۶۰
ملانوسیت ها.. ۲۶۰
دستور کار ۲۰-۱۵- ملانوسیت ها ۲۶۰
تأیید هویت ملانوسیتی ۲۶۲
سلول های خونساز.. ۲۶۲
کشت های دراز مدت مغز استخوان.. ۲۶۳
دستور کار۲۱-۱۵- کشت دراز مدت سلول های خونساز مغز استخوان.. ۲۶۳
آزمون های تشکیل دهنده کلنی در سلول های خونساز ۲۶۴
دستور کار۲۲-۱۵- آزمون های سلول های خونساز تشکیل دهنده کلنی.. ۲۶۵
دستور کار A: BFU-E، CFC-Mix و CFU-GEMM ۲۶۵
شناسایی کلنی ها ۲۶۶
دستور کار B: GM-CFC ۲۶۶
گنادها.. ۲۶۶

فصل شانزدهم

رفع مشکلات.. ۲۶۷
رشد سلولی آهسته.. ۲۶۷
محیط کشت ۲۶۸
خصوصیات محیط کشت.. ۲۶۹
معرف های ناپایدار ۲۶۹
گلوتامین ۲۶۹
سرم.. ۲۷۰
ترپیسین ۲۷۰
خلوص اجزاء سازنده ۲۷۰
آیا دستگاه خالص ساز آب درست کار می کند؟ ۲۷۰
رژیم نگهداری.. ۲۷۰
بی کربنات ۲۷۰
آنتی بیوتیک ها.. ۲۷۰
سرم.. ۲۷۰
پلاستیک ها ۲۷۱
شیشه آلات ۲۷۱
آلودگی میکروبی ۲۷۱
آلودگی مختلط با چند گونه ۲۷۱
آلودگی پیوسته.. ۲۷۱
آلودگی گسترده.. ۲۷۲
شناسایی نوع آلودگی ۲۷۳
باکتریایی، قارچی.. ۲۷۳
رفع آلودگی.. ۲۷۳
آلودگی شیمیایی.. ۲۷۳
شیشه آلات ۲۷۳
پی پت ها.. ۲۷۳
معرف های دیگر.. ۲۷۴

پودرها و آئروسل ها ۲۷۴
کشت اولیه ۲۷۴
راندمان پایین در کشت اولیه ۲۷۴
محیط کشت اشتباه ۲۷۴
سلولهای اشتباهی انتخاب شده اند ۲۷۴
آلودگی ۲۷۴
تمایز ۲۷۵
عدم تولید محصول ۲۷۵
غذا دهی ۲۷۵
تک لایه های منظم ۲۷۵
pH سریع کاهش می یابد ۲۷۵
کلون ها ۲۷۵
فاز چرخه سلولی در واکشت ۲۷۵
پیری ۲۷۵
محیط کشت ۲۷۵
رشد ناهموار ۲۷۵
کلونینگ ۲۷۶
کارایی پلیتینگ ضعیف ۲۷۶
کلنی های پراکنده ۲۷۶
توزیع غیر تصادفی ۲۷۶
سلولهای غیر چسبنده ۲۷۷
آلودگی متقاطع ۲۷۷
علایم آلودگی متقاطع ۲۷۷
جلوگیری از آلودگی متقاطع ۲۷۷
حذف آلودگی متقاطع ۲۷۷
منجمد نگهداری ۲۷۷
ظاهر تغییر یافته پس از منجمد نگهداری ۲۷۸
اتلاف استوک ۲۷۸
دانه دار بودن سلولها ۲۷۸
شمارش سلولی ۲۷۸
هموسیتومتر ۲۷۸
شمارش الکترونیک از طریق روزنه توسط مقاومت... .... ۲۷۹
زیستایی ۲۷۹
ظاهر ریخت شناسی ۲۷۹
آزمایش زیستایی ۲۷۹
سیتوتوکسیسیتی ۲۸۰

پیوست ۱

تهیه معرف ها ۲۸۱

پیوست ۲

رده های سلولی ۲۸۹

پیوست ۳

لینک بعضی از کلکسیون های کشت سلولی ۲۹۷

پیوست ۴

منابعی برای مطالعه بیشتر ۲۹۹

منابع ۳۰۱

مقدمه استاد

بیش از دو دهه از تلاش گسترده علمی کشور در راستای نهادینه نمودن زمینه های علم سلولی– ملکولی سپری می گردد. این علم که نقش انکار ناپذیری در کلیه حیطه ها و شئونات زندگی بشر داشته در طی این مدت به جایگاه رفیعی در کشور ارتقاء یافته و اکنون محققین زیادی در مراکز علمی کشور در حال انجام پژوهشهایی هستند که بعضی از آنها با پیشرفته ترین مراکز علمی دنیا همخوانی و رقابت دارند.

با توجه به این جهاد همه جانبه علمی و تلاش فراگیر صورت گرفته توسط اساتید و محققین عزیز لازم است سطوح مختلف دانشجویی، علی الخصوص در مقطع کارشناسی، زمینه های نظری و علمی مورد نیاز برای ورود به این دنیای پویا و تحول ساز علمی را کسب نمایند. در این راستا و با احساس نیاز به وجود یک منبع علمی- کاربردی در زمینه کشت سلول که قابل استفاده برای تمامی سطوح دانشجویی باشد علاقمند به ترجمه این اثر گشتیم. امید است که این اثر پاسخی مناسب به عطش علمی دانشجویان جوان و عزیز کشور در راه اعتلای انجام تحقیقات روز آمد و کاربردی باشد.

کتاب مرجع به نام Culture of Animal Cells توسط پروفسور R. Ian Freshney به رشته تحریر در آمده که آخرین چاپ آن (چاپ پنجم) برای ترجمه مورد استفاده قرار گرفته است. تجدید چاپ کتاب برای مرتبه پنجم که همراه با تجدید نظر و به روز نمودن مطالب بوده خود موید این است که کتاب انتخاب شده مفید و تأثیر گذار بوده و در سراسر دنیا مورد استقبال قرار گرفته است و به عنوان مرجع درس در بسیاری از دانشگاههای معتبر دنیا استفاده می گردد. امید است حاصل زحمات ارزشمند و بی وقفه آقای کاظمی مورد استفاده علاقمندان این حیطه علمی قرار گرفته و در راستای توسعه این علم موثر واقع گردد.

با آرزوی موفقیت روزافزون

دکتر رسول صالحی

مقدمه مترجم

سپاس به پیشگاه حضرت دوست که هرچه هست از اوست!

با رشد سریع زیست شناسی سلولی و ملکولی در طی دهه های اخیر و کاربرد گسترده آن در عرصه ای مختلف علوم زیستی و وجود آزمایشگاههای کشت سلولی در اکثر مراکز تحقیقاتی و دانشگاهی، خلاء وجود یک کتاب فارسی معتبر در این زمینه کاملاً مشهود می باشد. کتابی که اکنون در پیش رو دارید تلاشی است که در جهت ارائه یک منبع مناسب فارسی تهیه شده است و امید است خلاء موجود در این زمینه را مرتفع سازد.

کتاب حاضر بر گردان فارسی کتاب Culture of Animal Cells نوشته R. Ian Freshney می باشد که یکی از معتبرترین کتابهای مرتبط با کشت سلولی است و در سراسر جهان بعنوان یک منبع معتبر استفاده می شود. کتاب مذکور یکی از کاملترین منابع در مورد تکنیکها، تجهیزات، اصول و روشهای کشت سلولهای جانوری می باشد. این کتاب شامل مباحث تئوری و دستور کارهای عملی کشت سلولی می باشد ولی هدف و قسمت عمده کتاب مربوط به دستور کارهای عملی برای کشت انواع سلولهای مختلف و همچنین دستورکارهای روتین مورد استفاده در کل آزمایشگاه های کشت سلولی می باشد. با توجه به حجم زیاد کتاب مرجع، در ترجمه کتاب بعضی از فصول که تخصصی تر بوده و کمتر در آزمایشگاه ها استفاده می شوند، حذف شده اند. همچنین مطالب بعضی از فصول هم که از اهمیت کمتری برخوردار بودند خلاصه شده است. در برخی موارد برای کاملتر کردن مطالب کتاب از منابع دیگر مطالبی به بعضی از فصول اضافه شده است.

ار آنجایی که همانند علوم کاربردی دیگر واژه های علمی زیادی در مورد کشت سلولی وجود دارد، سعی شده است که در هر مورد از واژه فارسی مناسب استفاده شود ولی در بعضی از موارد که واژه فارسی مناسبی وجود نداشت از همان واژه لاتین استفاده شده است. برای جلوگیری از سر در گمی خوانندگان، واژه لاتین کلمات تخصصی در اولین تکرار داخل پرانتز، جلوی واژه فارسی آورده شده است.

با توجه به دقت و تلاشی بسیار زیادی که جهت اقرار از اشتباه صورت پذیرفته است ولی با این وجود متن حاضر خالی از اشتباه نمی باشد. لذا از تمامی خوانندگان محترم تقاضا دارم تا با ارسال نظرات اصلاحی و سازنده خود موجب رفع نارسایی ها و پربارتر شدن چاپ های بعدی این مجموعه گردند.

در اینجا لازم می دانم از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر رسول صالحی که تهیه این کتاب تحت راهنمایی های عالمانه ایشان صورت پذیرفت و همچنین سرکار خانم دکتر شقایق حق جوی جوانمرد که زحمت ویرایش این کتاب را متحمل شدند، تقدیر و تشکر نمایم. از همکاری صمیمانه همسرم خانم سعیده جمالی و تلاش بی شائبه سرکار خانم زهرا احمدی که زحمت تایپ این کتاب را بر عهده داشتند و همچنین از تمامی همکاران گروه ژنتیک قدردانی می نمایم. در پایان از مدیریت و کارکنان محترم موسسه انتشاراتی خسروی که نسبت به چاپ این اثر همت گماشتند، نهایت تشکر و قدردانی را می نمایم.

E-mail: Mohammadkazemi383@yahoo.com

تقدیم به همسرم و فرزندم آرین

فهرست اختصارات

AA	Amino acid
Ab	Antibody
ACTH	Adrenocorticotropic hormone
Ag	Antigen
ATCC	American type culture collection
bp	Base pairs (in DNA)
BPE	Bovine pituitary extract
BrUdR	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
BUdR	Bromodeoxyuridine
CAM	Cell adhesion molecule
CAM	Chorioallantoic membrane
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCTV	Closed-circuit television
CE	Cloning efficiency
CMC	Carboxymethylcellulose
CMF	Calcium and magnesium free saline
CMV	Cytomegalovirus
CS	Calf serum
DMEM	Dulbecco's modification of eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
D-PBSA	Dulbecco's phosphate buffered saline lacking Ca^{2+} and Mg^{2+}
D-PBSB	Dulbecco's phosphate buffered saline solution B
DT	Population doubling time
EBSS	Earle's balanced salt solution
EBV	Epstein-Barr virus
ECACC	European collection of animal cell cultures
ECGF	Endothelial cell growth factor
ECGS	Endothelial cell growth supplement
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
F10	Hams' F10
F12	Hams' F12
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
G_0	Gap in cell cycle when cell exit cycle
G_1	Gap one(of the cell cycle)
G_2	Gap two(of the cell cycle)
GLP	Good laboratory practice
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HAT	Hypoxanthine, aminopterin, thymidine
HBS	HEPES-buffered saline
HBsAg	Hepatitis B surface antigen
HBSS	Hanks' balanced salt solution

HCV	Hepatitis C virus
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leucocyte antigen
HuS	Human serum
IFN	Interferone
IL	Interleukin
kbp	Kilobase pairs (in DNA)
L-glu	L-glutamine
LI	Labeling Index
LPS	lipopolysaccharide
M199	Medium 199
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MEM	Eagle's minimal essential medium
MHC	Major histocompatability complex
MRA	Mycoplasma removal agent
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBCS	Newborn calf serum
NEAA	Non-essential amino acids
O.D.	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
PBSA	Phosphate buffered saline, solution A (Ca^{2+} and Mg^{2+} free)
PBSB	Phosphate buffered saline, solution B (Ca^{2+} and Mg^{2+} free)
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Plating efficiency
PE	PBSA/EDTA
PHA	Phytohaemagglutinin
PPD	Purified protein derivative
RPMI	Rosewell park memorial institute
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
S	DNA synthesis phase of cell cycle
S-MEM	MEM with low Mg^{2+} and no Ca^{2+}
TGF	Transforming growth factor
UPW	Ultra pure water
VEGF	Vascular endothelial growth factor

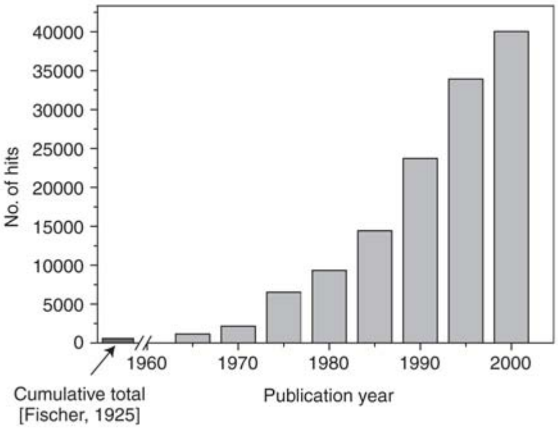
فصل اول

مقدمه

سابقه تاریخی

کشت بافت اولین بار در آغاز قرن بیستم به عنوان روشی برای مطالعه رفتار سلولهای حیوانی بدون تغییرات سیستمیک که ممکن است هم در طی هموستازی طبیعی و هم تحت تأثیر یک آزمایش در *in vivo* رخ دهد، ابداع شد. همانطور که نام آن دلالت دارد این تکنیک اولین بار با قطعات تفکیک نشده بافت انجام شد و رشد به مهاجرت سلولها از قطعه بافت، با میتوزهای اتفاقی در برون رشد (outgrowth) محدود بود. چون کشت سلولها از چنین اکسپلنت های اولیه (primary explants) بافت برای بیش از ۵۰ سال حکمفرما بود، جای تعجب نیست که علیرغم این واقعیت که اغلب پیشرفت عمده در این حوزه در نیمه دوم قرن بیستم با استفاده از کشت های سلولی تفکیک شده حاصل شد، نام کشت بافت به عنوان یک اصطلاح کلی باقی ماند.

تفکیک سلولهای اکسپلنت و سپس کشت سلولهای تفکیک شده اولین بار توسط Rous شرح داده شد. L929 اولین سویه سلولی کلون شده بود که با کلونینگ موئینه ای (capillary cloning) از سلولهای L موشی جداسازی شد. در دهه ۱۹۵۰ بود که تریپسین بعد از استفاده توسط Dulbecco برای به دست آوردن کشت های تک لایه پاساژ داده شده برای آزمونهای پلاک ویروسی (viral plaque assays) و تولید یک سوسپانسیون تک سلولی، به طور متداول استفاده شد. Gey اولین رده سلولی انسانی پیوسته HeLa را به دست آورد. سپس این رده سلولی زمانی که مفهوم لایه تغذیه کننده پرتوتابی شده با پرتو X (X-irradiated feeder layer) در کلونینگ مطرح گردید توسط puck کلون شد. در این زمان کشت بافت به طور گسترده تری استفاده شد که دلیل آن ورود آنتی بیوتیک ها بود که تکثیر دراز مدت رده سلولی را تسهیل کرد، هرچند بسیاری افراد در مورد استفاده پیوسته و خطر ایجاد عفونت های نهانی یا آلودگی های مقاوم به آنتی بیوتیک هشدار می دادند. دهه ۱۹۵۰ سالهای تکامل محیط های کشت تعریف شده بود که در نهایت منجر به تکامل محیط های کشت بدون سرم گردید.



شکل ۱-۱: رشد کشت بافت. تعداد موارد کشت سلولی در Pubmed از سال ۱۹۶۵. شکل قبل از ۱۹۶۰ از زندگی نامه Fischer برگرفته شده است.

در کل این کتاب، واژه کشت بافت (tissue culture) به عنوان یک اصطلاح کلی برای کشت اندام (organ culture) و کشت سلولی (cell culture) استفاده می شود. واژه کشت اندام همیشه دلالت بر یک کشت سه بعدی از بافت تفکیک نشده دارد که همه یا تعدادی از خصوصیات بافت شناسی بافت در *in vivo* را حفظ می کند. کشت سلولی به کشتی اطلاق می شود که از سلولهای تفکیک شده حاصل از بافت اصلی از یک کشت اولیه، از یک رده سلولی یا سویه سلولی توسط تفکیک آنزیمی، مکانیکی یا شیمیایی به دست می آید. اصطلاح کشت هیستوتایپیک (histotypic culture) دلالت بر این دارد که سلولها مجدداً متراکم شده یا رشد کرده تا ساختمان سه بعدی با دانسیته شبیه بافت را مثلاً با کشت در دانسیته بالا در یک چاهک فیلتردار (filter well)، تزریق و رشد زیاد یک تک لایه در فلاسک یا دیش، تجمع مجدد در سوسپانسیون بر روی آگار یا در جاذبه صفر واقعی یا شبیه سازی شده یا تراوش یک ماتریکس سه بعدی از قبیل ژل کلاژن ایجاد کنند. ارگانوتایپیک بر روشهای یکسانی دلالت داشته اما شامل سلول های دودمانهای مختلف، مثلاً کراتینوسیت های اپیدرمی به همراه کشت با فیبروبلاست های پوستی برای ایجاد یک معادل بافت(tissue equivalent) می شود.

Harrison قورباغه را احتمالاً به دلیل این که یک حیوان خونسرد بوده و در نتیجه به انکوباسیون نیازی ندارد به عنوان منبع بافت انتخاب کرد. به علاوه به دلیل این که نوزایی بافتی (tissue regeneration) در مهره داران پست تر متداول تر می باشد، شاید او احساس کرد که در مقایسه با پستانداران به احتمال بیشتری رشد در آنها صورت می پذیرد. هر چند روش او موج تازه ای از علاقه را در مورد کشت بافت در *in vitro* ایجاد کرد، افراد کمی از روش او برای انتخاب گونه ها پیروی کردند. نیازهای پزشکی توجه را معطوف حیوانات خونگرم کرد زیرا در آنها هم تکامل طبیعی و هم تکامل آسیب شناسی به انسان نزدیکتر می باشد. دسترسی به بافت های مختلف که خیلی از آنها در کشت به خوبی رشد می کنند، تخم مرغ جنین دار را به عنوان یک انتخاب مناسب مطرح ساخت، اما توسعه پرورش حیوانات آزمایشگاهی، مخصوصاً نژادهای جوندگان خالص از لحاظ ژنتیکی، پستانداران را به عنوان حیوانات مناسب مطرح ساخت. هر چند بافت جنین جوجه، انواع سلولی متنوعی را در کشت اولیه فراهم می سازد، اما بافت جوندگان دارای این مزیت می باشد که رده های سلولی پیوسته تولید کرده و یا مخزن قابل توجهی از تومورهای قابل کشت (transplantable tumors) می باشد. توسعه فناوری موش تراریخته (transgenic) به همراه زمینه ژنتیکی شناخته شده موش باعث انتخاب این حیوان به عنوان یک گونه مناسب شده است.

همچنین به دلیل این که تومورهای انسانی باعث ایجاد رده های سلولی پیوسته می شوند(مثل HeLa)، توجه به سمت بافت انسانی متمرکز شد که بعداً با مطالعات کلاسیک Leonardo Hayflick بر روی نیمه عمر محدود سلولها در کشت و نیازهای ویروس شناسان و ژنتیک ملکولی برای کار با نمونه های انسانی همراه شد. وقتی که تعدادی از محیط های کشت انتخابی مختلف فاقد سرم برای انواع سلولهای خاص از قبیل کراتینوسیت های اپیدرمی، اپی تلیوم برونش و اندوتلیوم عروقی توسعه پیدا کرد، کشت سلولهای انسانی بیشتر مورد توجه قرار گرفت. این فورمولاسیونها اکنون به صورت تجاری در دسترس می باشند، هر چند هزینه آنها در مقایسه با محیط های کشت معمولی بالا می باشد.

برای سالیان دارازی، مهره داران پست تر و بی مهرگان نادیده گرفته می شدند، هر چند که جنبه های بی نظیر تکامل آنها (ترمیم بافتی در دوزیستان و دگردیسی در حشرات) آنها را به سیستم های جالبی برای مطالعه اساس ملکولی تکامل مبدل ساخته است. اخیراً، نیازهای کشاورزی و کنترل آفت، مطالعات توکسیسیتی و ویروس شناسی را در حشرات مورد توجه قرار داده و تکامل فناوری ژنی اشاره بر این دارد که رده های سلولی حشرات با باکولوویروس(baculovirus) و وکتورهای دیگر، به دلیل جایگزین کردن توالی های ژنومی بزرگتری در DNA ویروسی و کاهش خطر تکثیر ویروس های بیماریزای انسانی ممکن است رده های سلولی تولید کننده مفیدی باشند. به علاوه اهمیت اقتصادی پرورش ماهی و نقش آب تازه و آلودگی دریا مطالعات بیشتری از تکامل طبیعی و بیماریزایی در ماهی را برانگیخته است. روشهای دستکاری سلولهای غیر پستانداران گرایش به پیروی از کشت سلولی پستانداران دارد، هر چند که هم اکنون تعداد محدودی از محیط های کشت اختصاصی برای سلولهای ماهی و حشرات در دسترس می باشد.

انواع تحقیقاتی که مخصوصاً وابسته به کشت سلولی می باشند در شکل ۲-۱ خلاصه شده اند:

۱) فعالیت داخل سلولی، مثل همانند سازی و نسخه برداری DNA، ساخت پروتئین، متابولیسم انرژی و متابولیسم دارویی ۲) جریانهای داخل سلولی مثل RNA، جابجایی (translocation) کمپلکس های گیرنده هورمونی و فرآیندهای انتقال علامت ناشی از آن و انتقال غشایی ۳) برهمکنش محیطی مثل تغذیه، عفونت، سیتوتوکسیسیتی، سرطان زایی، عمل دارو و برهمکنش های لیگاند-گیرنده ۴) برهمکنش سلول-سلول مثل ریخت زایی (morphogenesis) ، کنترل پاراکراین (paracrine control) ، کینتیک های تکثیر سلولی، همکاری متابولیک، اتصال سلولی و جنبش، برهمکنش ماتریکس ۵) ژنتیک شامل دستکاری ژنتیکی، ترانسفورماسیون و جاودان سازی ۶)

محصولات و ترشحات سلولی، بیوتکنولوژی، طراحی بیوراکتور، جمع آوری محصول و عمل آوری پایین دستی.

تکامل کشت سلولی بیشتر مدیون نیازهای دوشاخه اصلی از تحقیقات پزشکی می باشد: تولید واکسن های ضدویروسی و فهم نئوپلازی (neoplasia). استاندارد سازی شرایط و رده های سلولی برای تولید و سنجش ویروس ها، بدون شک عزم بیشتری را برای توسعه فناوری کشت بافت پیشرفته مخصوصاً تولید مقدار زیادی از سلولهای مناسب برای آنالیزهای بیوشیمیایی فراهم می سازد. این مورد به همراه پیشرفت های تکنیکی دیگر به واسطه تهیه محیط های کشت و سرم های مطمئن و با کنترل بیشتر آلودگی با آنتی بیوتیک ها و تجهیزات هوای تمیز امکان پذیر شده و کشت بافت را برای محدوده وسیعی از علایق در دسترس قرار داده است.

فشار فراینده ای از طرف گروه های حمایت کننده از حیوانات در مورد استفاده غیر ضروری از حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد. هر چند که اغلب افراد بر این باورند که استفاده از حیوانات برای مطالعات پیش کلینیکی(preclinical) مواد دارویی جدید لازم می باشد، اما استفاده وسیع از حیوانات برای توسعه مواد آرایشی و فعالیت های مشابه ممکن است از لحاظ اخلاقی قابل توجیه نباشد. بنابراین فشار فزاینده ای برای سوق دادن بیشتر مطالعات به سمت سنجش های *in vitro* وجود دارد، هر چند قبول آن هنوز نیازمند تأیید صحت و پذیرش عمومی می باشد. هر چند این کار چند سال قبل انتظار دوری به نظر می رسید، ورود سنجش های *in vitro* حساستر و آسانتر به همراه چشم انداز واقعی سنجش التهاب در *in vitro* باعث گسترش بی نظیر در آزمایشات *in vitro* گردید.

علاوه بر تحقیقات سرطان و ویروس شناسی، عرصه های دیگر تحقیقات به میزان زیادی مرهون تکنیک های کشت بافت می باشند. با ورود تکنیک های آمیختگی سلولی (cell fusion) و دستکاریهای ژنتیکی، ژنتیک سلولهای سوماتیک را به عنوان یک جزء عمده در آنالیزهای ژنتیکی حیوانات عالی تر از جمله انسان مبدل ساخته است. اکنون تکنیکهای زیادی برای نوترکیبی ژنتیکی شامل انتقال DNA، انتقال تک کروموزومی (monchromosal transfer) و انتقال هسته ای وجود دارد که به دورگه سازی سوماتیک به عنوان وسیله ای برای آنالیزهای ژنتیکی ودستکاری ژنتیکی افزوده شده است. انتقال DNA باعث توسعه تکنیک های زیادی برای انتقال DNA به سلولهای کشت داده شده شامل رسوب توأم کلسیم فسفات، لیپوفکشن(lipofection)،الکتروپوریشن(electroporation) و عفونت رتروویروسی شده است.

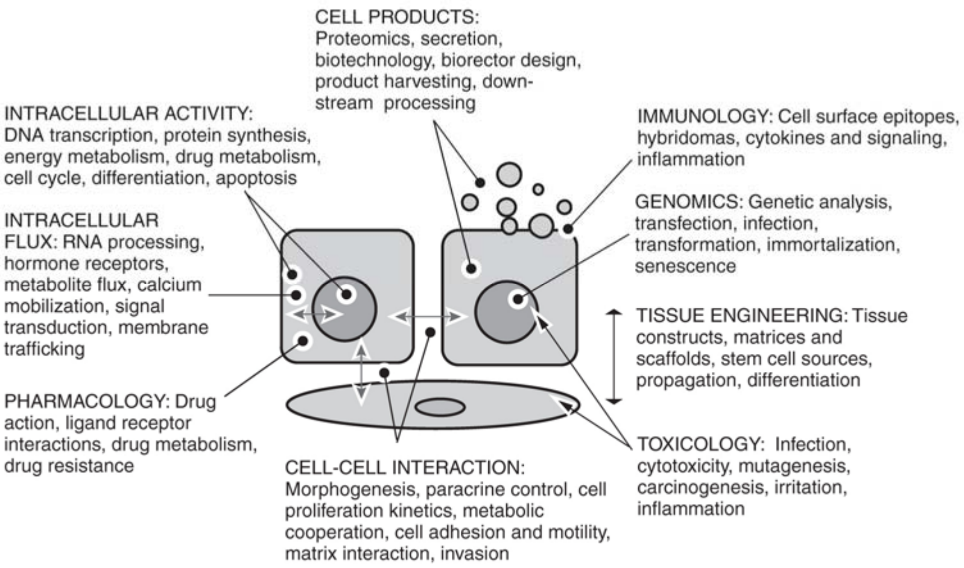
کشت بافت از طریق تکنیک آنتی بادی تک دودمانی در توسعه مطالعات ایمنی شناسی نقش بسیار موثری داشته است.

اکنون محصولات سلولی از قبیل هورمون رشد انسانی، انسولین و اینترفرون توسط سلولهای ترانسفکت شده (transfected cells) تولید می شوند، هر چند عدم انجام تغییرات پس از نسخه برداری (post transcriptional) از قبیل گلیکوزیلاسیون در باکتری ها باعث شده است پیشنهاد شود که سلولهای پستانداران ممکن است حامل های مناسب تری برای این کار باشند.

دیگر حوزه های مورد علاقه شامل مطالعه برهمکنش های سلولی و مکانیسم های کنترل داخل سلولی در تمایز سلولی و تکامل و تلاش برای تجزیه و تحلیل عملکرد عصبی می باشد. پیشرفت در تحقیقات عصب شناختی تا به حال مفید نبوده است هر چند کار با رده های سلولی تکثیر شده از مغز طبیعی یا بافت عصبی، همانند تکثیر نرونها در *in vitro* تا به حال بدون استفاده از سلولهای ترانسفورم شده امکان پذیر نبوده است. هر چند پیشرفت کشت سلولهای بنیادی جنینی انسان نشان می دهد که ممکن است این روش، کشت های همانند ساز (replicating cultures) را فراهم کرده که به نرونها تمایز می یابند.

فناوری کشت بافت در بسیاری از کاربردهای متداول در پزشکی و صنعت مورد پذیرش قرار گرفته است. تجزیه و تحلیل کروموزومی سلولهای حاصل از رحم توسط آمنیوسنتز می تواند اختلالات ژنتیکی را قبل از تولد آشکار کند، کیفیت آب آشامیدنی را می توان تعیین کرد و اثرات سمی ترکیبات دارویی و آلاینده های محیطی بالقوه را می توان در سنجش های تشکیل دهنده کلنی (colony forming) و آزمون های *in vitro* دیگر اندازه گیری کرد.

توسعه بیشتر کاربرد کشت بافت در مسائل پزشکی ناشی از این است که نشان داده شد که کشت سلول های اپیدرمی، صفحات تمایز یافته از لحاظ عملکردی را تشکیل داده و سلولهای اندوتلیال قادرند مویرگها را تشکیل دهند که احتمال پیوند از خود فرد (homografting) و جراحی ترمیمی با استفاده از سلولهای اختصاصی خود فرد مخصوصاً برای سوختگی های شدید را فراهم می سازد. با توانایی ترانسفکت کردن ژنهای طبیعی در سلولهای دارای نقص ژنتیکی، امکان پیوند این سلولهای تصحیح شده به بیمار وجود دارد. نشان داده شده است که کشت های ترانسفکت شده اپی تلیوم برونش رت که ژن گزارشگر β-gal را حمل می کنند وقتی که در دستگاه تنفسی به صورت آئروسل وارد شوند در پوشش برونش رت ترکیب می شوند. همچنین نشان داده شده است که سلولهای ماهواره ای کشت یافته در عضله اسکلتی رت زخمی وارد شده و هسته های سلولهای پیوند شده در میوتیوبهای سین سیشیال (syncytial) رشد کرده دیده می شوند.



شکل ۲-۱: کاربردهای کشت بافت.

دورنمای کشت سلولهای طبیعی از بافت بالغ یا جنینی یا کشت سلولهای به هم پیوسته از لحاظ ژنتیکی از بیمار مشابه، یک شاخه جدید از کشت به نام مهندسی بافت (tissue engineering) را به وجود آورده است که شامل تولید معادل های بافت توسط کشت ارگانوتایپیک، جداسازی و تمایز سلولهای بنیادی جنینی انسان و سلولهای بنیادی پرتوان بالغ از قبیل سلولهای بنیادی مزانشیمی، انتقال ژن، علم مواد (materials science) ، استفاده از بیوراکتورها و فناوری پیوند می باشد . موانع تکنیکی با سعی و تلاش مرتفع شده ولی مسائل اخلاقی در پیش رو قرار گرفته است. امکان پیوند نرونهای جنینی طبیعی در بیماران مبتلا به بیماری پارکینسون اثبات شده است. اکنون انجمن باید تصمیم بگیرد که تا چه اندازه مواد جنینی ممکن است برای این منظور استفاده شود. در حالیکه این امکان وجود دارد که سلولهای خود بیمار را بتوان رشد داد وبا ترانسفکشن ژن طبیعی مثلاً با ترانسفکت کردن ژن انسولین طبیعی در سلولهای جزیره ای β (β-islet cells) که از فرد دیابتی کشت داده شده است یا حتی ترانسفکت کردن انواع سلولهای دیگر از قبیل پیش سازی های عضله اسکلتی، سلولها را در معرض تغییر ژنتیکی قرار داد.

لقاح در *in vitro* (*in vitro* fertilization: IVF) که از آزمایشات اولیه در کشت جنین توسعه پیدا کرد، اکنون به طور گسترده ای استفاده می شود و در بسیاری از کشورها از لحاظ قانونی واخلاقی مورد پذیرش قرار گرفته است. هر چند در مورد تولید گامتها در *in vitro* از کشت سلولهای زایای (germ cells) جدا شده از بیضه و تخمدان یا از سلولهای بنیادی جنینی، چالشهای اخلاقی قابل ملاحظه ای وجود دارد. اووسیت های تخمدان جنین موش، کشت داده شده و تولید موشهای طبیعی کرده اند و همچنین اسپرماتیدهای (spermatids) حاصل از بیضه های گوساله نر، کشت داده شده و با سلولهای سرتولی کشت همزمان داده شده اند. کار مشابه ای با بیضه های موش، اسپرماتیدهایی را تولید کرده که برای لقاح تخمک های موش استفاده شده است که در موشهای بالغ بارور توسعه پیدا کرده است.

مزیت های کشت بافت

کنترل محیط

دو مزیت عمده کشت بافت(جدول ۲-۱)، کنترل محیط فیزیکی و شیمیایی(pH ، درجه حرارت، فشار اسمزی و فشار O_2 و CO_2) می باشد که می توان آنها را بسیار دقیق کنترل کرد و شرایط فیزیولوژیکی که ممکن است نسبتاً ثابت نگهداشته شود اما همیشه نمی توان آنرا تعریف کرد. اغلب رده های سلولی هنوز به تکمیل محیط کشت با سرم یا اجزاء تعریف نشده دیگر نیاز دارند. این مکمل ها در معرض تغییرات بچ بوده و دارای اجزاء تعریف نشده ای از قبیل هورمونها و مواد تنظیم کننده دیگر می باشند. تشخیص تعدادی از اجزاء ضروری سرم به همراه فهم بهتر از عوامل تنظیم کننده تکثیر سلولی، جایگزینی سرم با اجزاء تعریف شده را آسان ساخته است. چون

جدول ۱-۱: مزیت های کشت بافت

مقوله	مزیت ها
محیط فیزیکوشیمیایی	کنترل pH، درجه حرارت، اسمولالیته و گازهای حل شده
شرایط فیزیولوژیکی	کنترل غلظت هورمونها و مواد غذایی
ریز محیط	تنظیم ماتریکس، برهمکنش سلول-سلول، انتشار گازی
همگنی رده سلولی	در دسترس بودن محیط های کشت انتخابی، کلونینگ
تعیین هویت	سلول شناسی و رنگ آمیزی ایمنی به آسانی انجام می شود
نگهداری	می توان در نیتروژن مایع نگهداری کرد
تایید	منشأ، تاریخچه، خلوص را میتوان تایید و ثبت کرد
تکرار و تغییرپذیری	کمیت سنجی آسان است
صرفه جویی معرف	کاهش حجم ها، دسترسی مستقیم به سلولها، هزینه پایین تر
کنترل C×T	توانایی تعیین دوز، غلظت (C) و زمان (T)
مکانیزه کردن	با میکروتیتراسیون و استفاده از رباتها امکان پذیر است
کاهش استفاده از حیوان	سیتوتوکسیسیتی و غربالگری مواد دارویی، آرایشی و غیره

جدول ۲-۱: محدودیت های کشت بافت

مقوله	مثالها
مهارت لازم	دستکاری استریل آلودگی شیمیایی آلودگی میکروبی آلودگی متقاطع
کنترل محیطی	مکان کار، انکوباسیون، کنترل pH، سطح محدودکنندگی و دفع مواد دارای مخاطره زیستی
کمیت و هزینه	تجهیزات سرمایه ای برای افزایش مقیاس محیط کشت، سرم پلاستیک های یک بار مصرف
ناپایداری ژنتیکی	ناهمگنی، تغییر پذیری
ناپایداری فنوتیپی	تمایز زدایی سازگاری رشد بیش از حد انتخابی
شناسایی نوع سلول	نشانگرها همیشه بیان نمی شوند از لحاظ بافت شناسی خلق مجدد مشکل می باشد هندسه و ریز محیط سیتولوژی را تغییر می دهد

آزمایشگاهها در جستجوی بیان خواص فنوتیپی طبیعی سلولها در *in vitro* می باشند، نقش ماتریکس خارج سلولی بسیار مهم می باشد.

تعیین هویت و همگنی نمونه

نمونه های کشت همواره ناهمگن می باشند. نمونه های تکراری حتی از یک بافت از لحاظ انواع سلولهای تشکیل دهنده متفاوت می باشند. بعد از یک یا دو پاساژ، فرض می شود که رده های سلولی کشت داده شده یک حالت همگن (یا حداقل یکنواخت) را دارند، زیرا سلولها در هر بار انتقال به صورت تصادفی مخلوط شده و فشار انتخابی شرایط کشت منجر به ایجاد یک کشت همگن از نوع سلولی نیرومند می شود. بنابراین در هر بارکشت، نمونه های تکراری مشابه همدیگر بوده و خصوصیات رده ممکن است برای چندین نسل یا حتی اگر رده سلولی در نیتروژن مایع ذخیره شود به طور نامحدود ثابت باقی بماند. به دلیل این که نمونه های تکراری آزمایشی یکسان می باشند، نیاز برای آنالیزهای آماری واریانس کاهش می یابد.

وجود تست های دقیق برای تعیین هویت رده سلولی و آلودگی به این مفهوم می باشد که استوک های ذخیره شده را می توان برای تحقیقات آینده و استفاده تجاری تأیید کرد.

صرفه جویی، مقیاس و مکانیزه کردن

کشت ها را می توان به طور مستقیم در معرض یک ماده در یک غلظت پایین تر و مشخص و با دسترسی مستقیم به سلول قرار داد. در نتیجه نسبت به تزریق در *in vivo* که ٪۹۰ از ماده توسط دفع و توزیع در بافت های دیگری به جزء بافت مورد مطالعه از دست می رود، به ماده کمتری نیاز می باشد. آزمایشات غربالگری با متغیرها و تکرارهای زیاد ارزان تر بوده و از مشکلات قانونی و اخلاقی که در آزمایش با حیوانات وجود دارد اجتناب می شود. پیشرفتهای جدید در پلیت های چاهک دار و استفاده از رباتها باعث صرفه جویی قابل توجهی در وقت و میزان مواد مصرفی می شود.

الگو سازی *in vitro* از شرایط *in vivo*

تکنیک های تزریق، انتقال ترکیبات آزمایشی خاص که در غلظت، مدت زمان مجاورت و حالت متابولیک تنظیم می شوند را امکان پذیر می سازد. همچنین توسعه الگوهای هیستوتاپیک و ارگانوتاپیک دقت الگو سازی *in vivo* را افزایش می دهد.

محدودیت ها

مهارت

تکنیک های کشت باید در شرایط کاملاً سترون انجام شود چون سلولهای حیوانی بسیار کندتر از بسیاری از آلوده کننده های متداول از قبیل باکتریها، کپکها و مخمرها رشد می کنند. به علاوه برخلاف میکروارگانیسم ها، سلولهای حیوانات چند سلولی به صورت مجزا وجود نداشته و در نتیجه قادر نیستند به صورت مستقل بدون وجود یک محیط پیچیده شبیه پلاسمای خون یا مایع بین بافتی ادامه حیات دهند.

کمیت

یک محدودیت عمده کشت سلولی هزینه تلاش و موادی است که برای تولید مقدار نسبتاً کمی بافت مصرف می شود. حداکثر مقدار واقع بینانه به ازای هر بچ برای اکثر آزمایشگاههای کوچک(با دو یا سه نفر که کشت بافت انجام می دهند) ممکن است g ۱۰-۱ سلول باشد. با کمی تلاش بیشتر و با استفاده از امکانات یک آزمایشگاه بزرگتر، به دست آوردن g ۱۰۰-۱۰ سلول امکان پذیر است؛ بیش از g ۱۰۰ سلول مخصوص آزمایشگاههای در مقیاس صنعتی می باشد. این سطح از تولید بیشتر از میزان تولید شده در بسیاری از آزمایشگاههاست اما اگر امکانات خاص فراهم شود دور از دسترس نمی باشد و حتی امکان تولید در حد کیلوگرم هم وجود دارد. هزینه تولید سلولها در کشت ۱۰ برابر استفاده از بافت حیوانی می باشد. در نتیجه اگر مقادیر زیادی از بافت (بیشتر از g ۱۰) مورد نیاز باشد، دلایل تهیه آنها توسط کشت باید خیلی متقاعد کننده باشد. برای مقادیر کمتر بافت (حدود g ۱۰) هزینه ها آسانتر در مخارج متداول جذب می شوند اما همیشه در نظر گرفتن این که آزمون ها یا روش های کار مقدماتی را می توان در مقیاس کوچک پیاده کرد، ارزشمند است. سنجش های در مقیاس نیمه کوچک یا کوچک اغلب به دلیل کاهش زمانهای دستکاری، حجم ها، زمانهای سانتریفوژ و غیره سریعتر می باشند و در اغلب موارد آسانتر به صورت اتوماتیک در می آیند.

تمایز زدایی و انتخاب

وقتی که در دهه ۱۹۵۰ اولین پیشرفتهای عمده در تکثیر رده سلولی حاصل شد، بسیاری از افراد مشاهده کردند که خصوصیات فنوتیپی مخصوص بافتی که سلولها از آن منشاء گرفته اند از دست می رود. این اثر به دلیل تمایز زدایی(dedifferentiation) می باشد که این فرآیند برعکس تمایز می باشد اما بعدها نشان داده شد که به میزان زیادی به دلیل رشد بیش از حد سلول های تمایز نیافته دودمان مشابه یا مختلف می باشد. اکنون توسعه محیط های کشت

انتخابی فاقد سرم، جداسازی دودمان های خاص را کاملاً امکان پذیر ساخته است و تحت شرایط مناسب، بسیاری از خصوصیات تمایزی این سلولها ممکن است به حالت اول برگردد.

منشاء سلول ها

اگر خصوصیات تمایزی به هر دلیلی از دست برود، ارتباط دادن میان سلولهای کشت داده شده با سلولهای عملکردی بافتی که آنها از آن منشاء گرفته اند مشکل می باشد. نشانگرهای پایدار برای تعیین هویت سلولها مورد نیاز می باشد؛ به علاوه ممکن است لازم باشد که شرایط کشت به گونه ای تغییر کند که این نشانگرها بیان شوند.

ناپایداری

ناپایداری یک مشکل عمده بسیاری از رده های سلولی پیوسته می باشد که از ساختمان کروموزومی آنوپلوئید ناپایدار آنها منشاء می گیرد. حتی در کشت های کوتاه مدت سلولهای ترانسفورم نشده، ناهمگنی در میزان رشد و ظرفیت تمایز در داخل جمعیت قادر به ایجاد تغییر پذیری از یک پاساژ به پاساژ دیگر می باشد.

تفاوت های عمده در *in vitro*

بسیاری از تفاوت ها در رفتار سلولی بین سلولهای کشت یافته و همتاهای آنها در *in vivo* از تفکیک سلولها از یک محیط سه بعدی و تکثیر آنها بر روی یک بستر دو بعدی ناشی می شود. برهمکنش های سلولی مخصوص مشخصه بافت شناسی بافت از دست می رود و همچنان که سلول ها گسترش می یابند، متحرک شده و در بسیاری از موارد شروع به تکثیر کرده به طوری که نسبت رشد جمعیت سلولی افزایش می یابد. وقتی که یک رده سلولی تشکیل می شود، فقط یک یا دو نوع سلول را می تواند بیان کند و بسیاری از برهمکنش های سلول- سلول هتروتایپیک از دست می رود.

همچنین محیط کشت، فاقد چندین جزء سیستمیک درگیر در تنظیم هموستاتیک *in vivo* ، مخصوصاً در مورد سیستم های عصبی و غدد مترشحه داخلی می باشد. بدون این کنترل، متابولیسم سلولی ممکن است در *in vitro* نسبت به *in vivo* بیشتر ثابت باشد اما ممکن است کاملاً بیانگر بافتی که سلول ها از آن منشاء گرفته اند نباشد. تشخیص این واقعیت باعث وارد شدن تعدادی از هورمونهای مختلف در محیط های کشت شده و به نظر می رسد که احتمالاً این روند ادامه خواهد یافت. متابولیسم انرژی در *in vitro* به طور عمده توسط گلیکولیز انجام شده و هر چند چرخه اسید سیتریک هنوز هم وجود دارد اما از نقش کمتری برخوردار می باشد.

انواع کشت بافت

سه روش اصلی برای شروع یک کشت وجود دارد: ۱)کشت اندام (organ culture) دلالت بر این دارد که ویژگی های معماری که بافت در *in vivo* دارد حداقل تا اندازه ای در کشت حفظ شده است. بافت در حد فاصل گاز- مایع که برای حفظ شکل کروی یا سه بعدی مساعد است کشت داده می شود. ۲) در کشت اکسپلنت اولیه (primary explant culture) یک تکه از بافت در حد فاصل شیشه (یا پلاستیک)- مایع قرار داده می شود تا بعد از اتصال، مهاجرت در سطح بستر جامد افزایش یابد. ۳) کشت سلولی (cell culture) دلالت بر این دارد که بافت یا تکه رشد کرده حاصل از اکسپلنت اولیه، به سوسپانسیون سلولی تفکیک شده (به صورت مکانیکی یا آنزیمی) و سپس این سوسپانسیون سلولی را می توان به صورت تک لایه چسبنده بر روی بستر جامد یا به صورت شناور در محیط کشت رشد کشت داد.

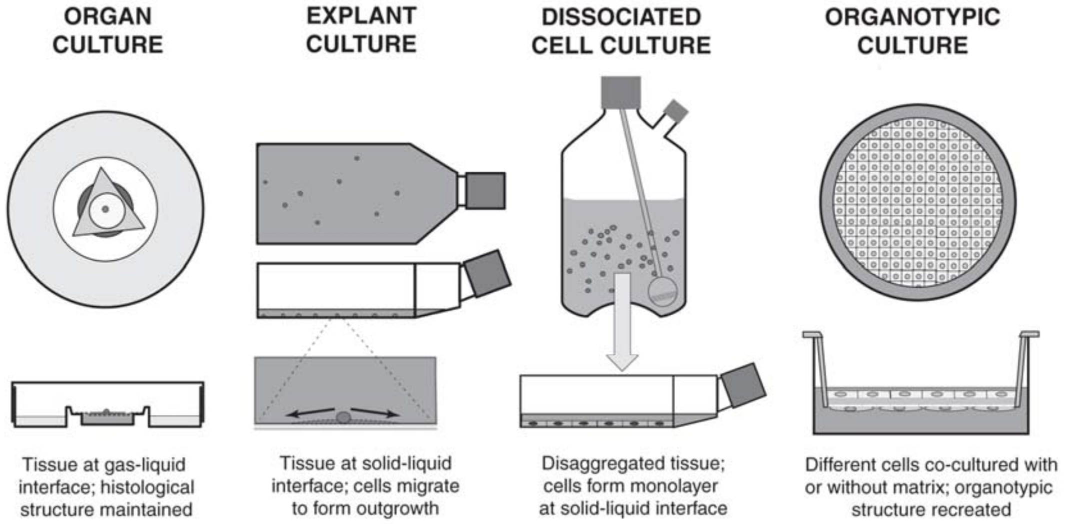
به دلیل حفظ برهمکنش های سلولی موجود در بافتی که کشت از آن منشاء می گیرد، در کشت اندام ویژگی های تمایزی آن بافت حفظ می شود. سلولها سریع رشد نکرده(تکثیر سلولی به اطراف اکسپلنت محدود بوده و بیشتر به بافت جنینی محدود می باشد) و بنابراین نمی توانند تکثیر شوند؛ هر آزمایش نیازمند ایجاد اکسپلنت های جدید بوده که باعث زحمت بیشتر شده و قابلیت تکثیر نمونه نسبت به کشت سلولی کمتر می باشد. بنابراین تعیین کمیت مشکل تر بوده و مقدار موادی که می توان کشت داد به خاطر ابعاد اکسپلنت (حدود ۱ mm^3) و تلاش مورد نیاز برای تشریح و ایجاد کشت محدود می باشد. هر چند کشت اندام برهمکنش های بافت شناسی خاص را حفظ می کند.

کشت های سلولی ممکن است از اکسپلنت های اولیه یا سوسپانسیون های سلولی تفکیک شده منشاء بگیرند. چون تکثیر سلولی در چنین کشت هایی وجود دارد، تکثیر رده های سلولی امکان پذیر می شود. یک کشت تک لایه یا سوسپانسیون سلولی دارای یک نسبت رشد زیاد را می توان توسط تیمار آنزیمی یا رقت ساده تفکیک کرد و مجدداً در ظروف جدید بذرافشانی کرد و یا کشت داد. این کار پاساژ نامیده می شود و کشت های دختری آغاز رده سلولی می باشند.

تشکیل یک رده سلولی از یک کشت اولیه نشان دهنده ۱) یک افزایش در تعداد کل سلولها در طی چندین نسل ۲) برتری نهایی سلول ها یا دودمانهای سلولی با ظرفیت رشد بالا و ۳) یک درجه از یکنواختی در جمعیت سلولی می باشد. رده سلولی را می توان تعیین هویت کرد و مشخصات، برای اکثر دوره عمر

محدود به کار خواهد رفت. اصطلاح رده های سلولی پیوسته (continuos cell lines) معمولاً نشان دهنده یک تغییر فنوتیپی یا ترانسفورماسیون می باشد. وقتی که سلولها توسط کلونینگ یا روش های دیگر از یک کشت انتخاب می شوند، زیر رده به عنوان یک سویه سلولی (cell strain) شناخته می شود. رده های سلولی یا سویه های سلولی ممکن است به صورت یک تک لایه چسبنده یا در سوسپانسیون تکثیر شوند. کشت تک لایه دلالت بر این دارد که اگر به سلولها فرصت کافی داده شود، سلولها به بستر چسبیده و تکثیر خواهند شد. وابستگی لنگر گاهی (anchorage dependence) به این معنی می باشد که اتصال به (و معمولاً مقداری انتشار در) بستر شرط لازم برای تکثیر سلولی می باشد. کشت تک لایه روش کشت اغلب سلولهای طبیعی به استثنای سلولهای خونساز می باشد. کشت های سوسپانسیون از سلولهایی منشاء می گیرند که قادرند بدون اتصال زنده مانده و تکثیر یابند[استقلال لنگر گاهی(anchorage independent)]. این توانایی محدود به سلولهای خونساز، رده های سلولی ترانسفورم شده و سلولهای تومورهای بدخیم می باشد. هر چند می توان نشان داد که نسبت اندکی از سلولهایی که قادر به تکثیر در حالت سوسپانسیون می باشند در بسیاری از بافتهای طبیعی وجود دارند. هویت این سلولها مجهول است اما فرض می شود با سلول بنیادی یا سلول پیش ساز غیر متعهد ارتباط داشته باشند. این عقیده دلالت بر این دارد که بعضی از سلولهای کشت داده شده نمایانگر منابع پیش ساز (precursor pools) در داخل بافت مبداء می باشند. رده های سلولی کشت داده شده در مقایسه با سلولهایی که کاملاً تمایز یافته اند بیشتر بیانگر قسمت های سلولی پیشرو در *in vivo* می باشند چون معمولاً بیشتر سلولهای تمایز یافته تقسیم نمی شوند.

چون کشت های سلولی می توانند به صورت یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت یا تک لایه تکثیر شوند، کشت های سلولی دارای مزیت های فراوانی در کمیت سنجی، تعیین هویت و نمونه برداری تکراری می باشند اما فاقد پتانسیل برهمکنش سلول- سلول و سلول- ماتریکس که در کشت های اندام وجود دارد، می باشند. به همین دلیل بسیاری از افراد برای ساخت ساختارهای سلولی سه بعدی با استفاده از توده های موجود در سوسپانسیون سلولی یا با تزریق کشت های با دانسیته بالا بر روی مجموعه ها یا غشاهای میکروکاپیلاری تلاش می کنند. چنین پیشرفت هایی نیازمند ابداع یا حداقل تعریف مجدد واژه های خاص می باشد. هیستو تایپیک یا کشت هیستو تایپیک یا کشت نسج (histoculture) به مفهوم کشت با دانسیته بالا یا مشابه یک نوع سلول می باشد در حالی که کشت ارگانوتایپیک دلالت برحضور بیش از یک نوع سلول داشته که می توانند همانند بافت مبداء دارای برهمکنش باشند. کشت های ارگانوتایپیک دورنمای تازه ای برای مطالعه برهمکنش سلولی در میان جمعیت های مشخص از سلولهای همگن و سلولهایی که از لحاظ ژنتیکی و فنوتیپی تعریف شده می باشند را فراهم می سازد.



شکل ۳-۱: انواع کشت بافت.

جدول ۳-۱: ویژگیهای انواع مختلف کشت ها

مقوله	کشت اندام	اکسپلنت	کشت سلولی
منبع	اندامهای جنینی، قطعات بافت بالغ	قطعات بافت	بافت تفکیک شده، کشت اولیه، رده سلولی تکثیر شده
تلاش مورد نیاز	زیاد	متوسط	کم
تعیین هویت	آسان، بافت شناسی	سیتولوژی و نشانگرها	سنجش های بیوشیمیایی، ملکولی، ایمنی شناسی و سیتولوژیکی
بافت شناسی	آموزنده	مشکل	غیر قابل اجرا
تمایز بیوشیمیایی	امکان پذیر	ناهمگن	از دست رفته اما ممکن است دوباره القا شود
تکثیر	غیر ممکن	از برون رشد امکان پذیر است	روش استاندارد
نمونه برداری تکراری	تغییر بالا در بین نمونه ها	تغییر بالا در بین نمونه ها	تغییر اندک در بین نمونه ها
قابلیت تولید مجدد			
همگنی			
کمیت سنجی	مشکل	مشکل	آسان؛ تکنیکهای زیادی موجود می باشد

جدول ۴-۱: واکشت

مزیت ها	معایب
تکثیر	آسیب حاصل از تفکیک مکانیکی یا آنزیمی
سلولهای بیشتر	انتخاب سلولها با کشت سازگار شده است
امکان کلونینگ	رشد بیش از حد سلولهای غیراختصاصی یا استروما
افزایش همگنی	ناپایداری ژنتیکی
تعیین هویت نمونه های تکراری	از دست رفتن ویژگیهای تمایزی(ممکن است القا پذیر باشند)
ذخیره سازی به حالت منجمد	افزایش خطر تشخیص اشتباه یا آلودگی متقاطع

فصل دوم

بیولوژی سلولهای کشت یافته

شرایط محیطی کشت

غالباً استفاده از سلول‌های کشت یافته به عنوان مدلی برای عملکرد فیزیولوژیک در *in vivo* مورد انتقاد بوده است. اغلب به دلیل اینکه محیط سلولی تغییر یافته است، سلول‌ها ویژگی های اختصاصی نوع سلولی مشابه در *in vivo* را نشان نمی‌دهند. چون رده‌های سلولی فاقد ناهمگنی و ساختار سه بعدی موجود در *in vivo* می‌باشند و محیط هورمونی و غذایی تغییر یافته است برهمکنش سلول ـ سلول و سلول ـ ماتریکس در *in vitro* کاهش می‌یابد. این امر محیطی را فراهم ساخته که گسترش، مهاجرت و تکثیر سلول‌های غیراختصاصی را بیشتر از بیان عملکردهای تمایز یافته پشتیبانی می‌کند. تأثیر محیط بر روی کشت توسط چهار عامل بیان می‌شود:

۱) ماهیت بستری که سلول‌ها بر روی آن و یا داخل آن رشد می‌کنند که ممکن است به صورت جامد مانند رشد تک لایه بر روی پلاستیک، نیمه جامد مانند ژلهایی مثل کلاژن یا آگار یا مایع مانند کشت سوسپانسیون باشد.

۲) درجه تماس با سلولهای دیگر

۳) اجزای تشکیل دهنده فیزیکوشیمیایی و فیزیولوژیکی محیط کشت

۴) اجزای تشکیل دهنده فاز گازی و

۵) درجه حرارت انکوباسیون

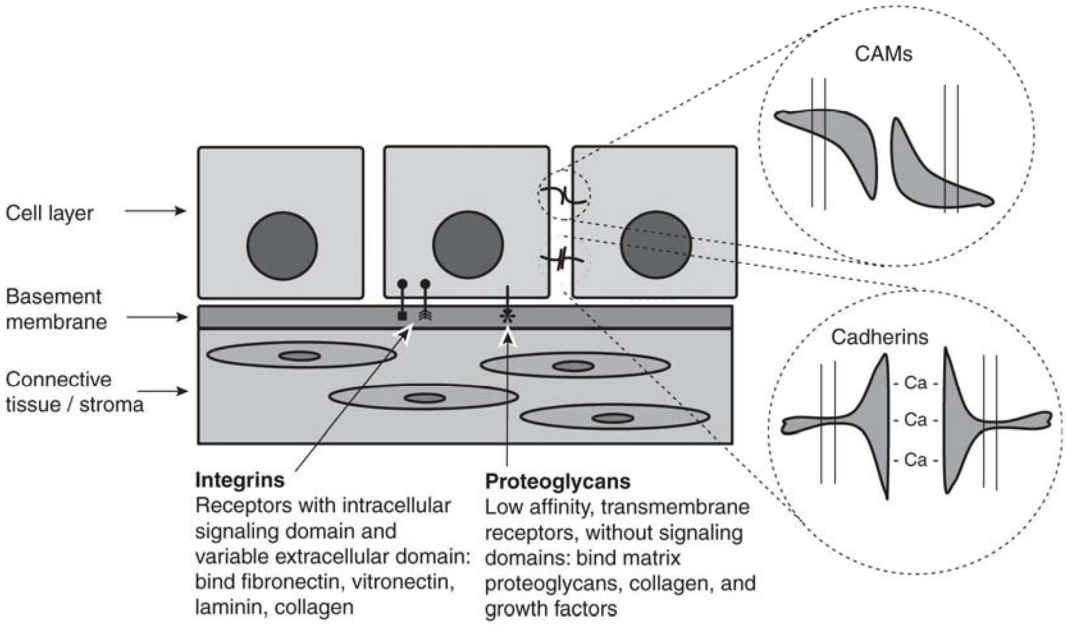
تدارک محیط مناسب، شامل چسبندگی بستر، غلظت های مواد غذایی و هورمون‌ها یا فاکتورهای رشد و برهمکنش سلولی برای بیان عملکردهای اختصاصی ضروری می باشد.

اتصال سلولی

اغلب سلول‌های مربوط به بافت‌های جامد به صورت تک لایه چسبنده رشد می‌کنند، مگر این که ترانسفورم شده و غیروابسته به تکیه‌گاه شوند و بعد از جداسازی یا واکشت، برای این که سلول‌ها شروع به تکثیر کنند لازم است که چسبیده و بر روی بستر گسترش یابند. در ابتدا مشخص شد که سلول‌ها قادرند به شیشه که دارای بار منفی اندک می‌باشد، چسبیده و گسترش یابند. بعد ها نشان داده شد که بعضی از پلاستیک‌ها مثل پلی استیرن اگر به صورت صحیح با یک دشارژ کننده یونی الکتریکی یا پرتوهای یونیزان دارای انرژی بالا تیمار شوند، سلول‌ها قادرند به آنها بچسبند. ما اکنون می‌دانیم که اتصال سلولی توسط گیرنده‌های سطحی سلولی اختصاصی در ماتریکس خارج سلولی میانجیگری می‌شود، بنابراین احتمالاً به نظر می‌رسد که ممکن است گسترش سلولها با ترشح پروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌های ماتریکس خارج سلولی توسط سلول‌ها انجام شود. ماتریکس به بستر باردار متصل شده و سپس سلول توسط گیرنده‌های اختصاصی به ماتریکس اتصال می‌یابد. بنابراین شیشه یا پلاستیکی که با رشد سلول قبلی شرطی شده است اغلب سطح بهتری را برای اتصال فراهم ساخته و بسترهایی که با اجزای تشکیل دهنده ماتریکس از قبیل فیبرونکتین یا کلاژن یا مشتقات آن از قبیل ژلاتین تیمار شده‌اند، کمک خواهند کرد تا سلول‌ها راحت‌تر چسبیده و تکثیر شوند.

در مورد سلول‌های شبیه فیبروبلاست (fibroblast-like cells)، نیاز اصلی، اتصال به بستر و انتشار می‌باشد و سلولها در دانسیته‌های پایین به طور مجزا جابه‌جا می‌شوند. سلول‌ها اپی تلیال برای زیستایی و رشد بهینه باید اتصال سلول به سلول مناسب ایجاد کنند، بنابراین تمایل دارند که به صورت تکه‌هایی (patches) رشد کنند.

ملکول‌های اتصال سلولی

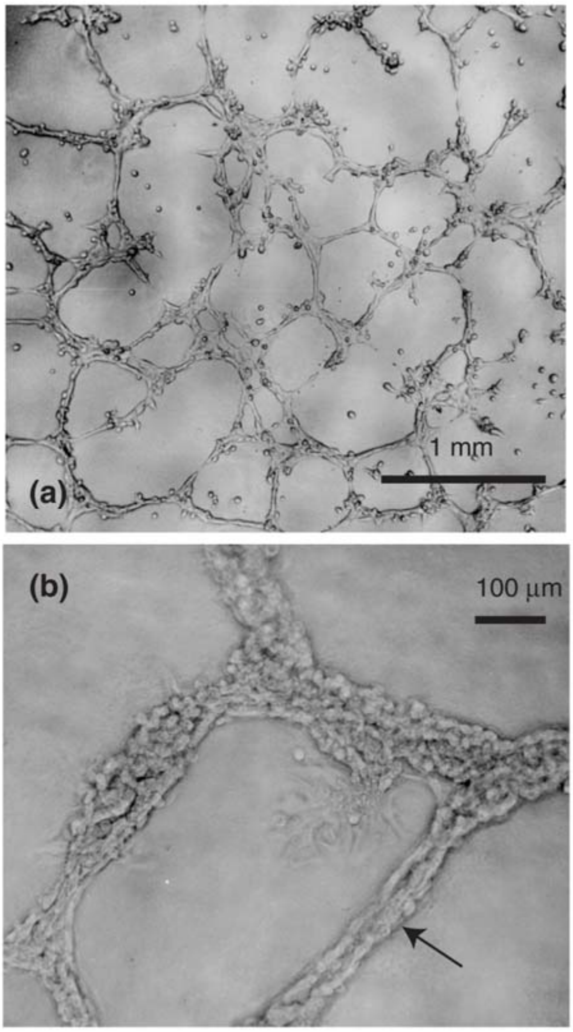


شکل ۱-۲: اتصال سلولی. نمایش هندسی یک لایه از سلولهای اپی تلیال بر روی بافت همبند حاوی فیبروسیت ها که توسط یک لایه نازک جدا شده است. CAMs و کدهرین ها بین سلولهای مشابه، اینتگرین ها و پروتئوگلیکانها بین لایه اپی تلیال و ماتریکس لایه پایه نمایش داده شده اند.

مشخص شده است که سه گروه عمده از پروتئین‌های غشایی (transmembrane proteins) در اتصال سلول-سلول و سلول- بستر دخالت دارند. ملکول‌های اتصال سلول-سلول، CAMs (غیروابسته به کلسیم) و کدهرین ها (وابسته به کلسیم) دردرجه اول در برهمکنش میان سلول‌های مشابه شرکت دارند. این پروتئین‌ها به صورت خود واکنشگر (self-interactive) هستند، یعنی ملکول‌های مشابه در سلول‌های مقابل با همدیگر برهمکنش دارند. برهمکنش‌های بستر سلولی در درجه اول توسط اینتگرین‌ها، رسپتورهای ملکول‌های ماتریکس مثل فیبرونکتین، entactin، لامینین و کلاژن صورت می‌گیرد که از طریق یک واحد تکراری ویژه که معمولاً حاوی توالی آرژنین-گلیسین-اسید آسپارتیک (RGD) می‌باشد به یکدیگر متصل می‌شوند. هر اینتگرین شامل یک زیر واحد α و یک زیر واحد β می‌باشد که نواحی خارج سلولی آنها به شدت پلی‌مورفیک می‌باشد، بنابراین تنوع زیادی را در میان اینتگرین‌ها ایجاد می‌کنند. هم اینتگرین ها و هم کدهرین ها با وینکولین واکنش می دهند که مرحله مهم در پیام رسانی به هسته است.

گروه سوم مولکول‌های اتصال سلولی، پروتئوگلیکانهای غشایی می‌باشند که همچنین با اجزای تشکیل دهنده ماتریکس از قبیل کلاژن یا پروتئوگلیکان‌های دیگر، اما نه از طریق واحد تکراری RGD، برهمکنش دارند. همچنین بعضی از پروتئوگیلگان‌های غشایی و محلول به عنوان گیرنده‌های فاکتور رشد با میل کششی پایین عمل کرده و ممکن است فاکتور رشد را به گیرنده با میل کششی بالا که در دایمریزاسیون آن شرکت دارد، تثبیت، فعال و یا جابه‌جا کنند.

جداسازی بافت یا کشت تک لایه چسبیده توسط پروتئاز، تعدادی از ماتریکس‌های خارج سلولی را هضم کرده و حتی ممکن است تعدادی از نواحی خارج سلولی پروتئین‌های غشایی را تجزیه کرده و باعث جدا شدن سلول‌ها از یکدیگر شود. معمولاً سلول‌های اپی تلیال نسبت به جداسازی مقاوم‌تر می‌باشند زیرا مجموعه‌های اتصالی محکم‌تری دارند



شکل ۲-۲: سلولهای A549 که بر روی ماتریژل رشد داده شده اند. کشت سلولهای آدنوکارسینوما A549 رشد یافته بر روی ماتریژل. (a) عکس با بزرگنمایی کم که تشکیل شبکه را ۲۴ ساعت بعد از بذرافشانی در 1×10^5 cells/mL نشان می دهد. (b) بزرگنمایی بیشتر، ۳ روز پس از بذرافشانی در 1×10^5 cells/mL.

(دسموزوم‌ها، اتصالات چسبنده و اتصالات محکم) که آنها را در کنار هم نگه می‌دارد، در حالی که سلول‌های مزانشیمال که برای اتصال بین سلولی به برهمکنش‌های ماتریکس بیشتر وابسته می‌باشند، آسان‌تر جدا می‌شوند. همچنین ممکن است سلول‌های اندوتلیال در کشت اتصالات محکم را بیان کنند، به خصوص اگر به مدت طولانی‌تری در حالت تراکم بر روی یک ماتریکس پیش ساخته قرار داده شوند و جداسازی آنها می‌تواند مشکل باشد. درهر صورت سلول‌ها باید قبل از اتصال، پروتئین‌های ماتریکس را مجدداً ساخته و یا باید بستر پوشیده شده با ماتریکس در اختیار آنها گذاشته شود.

اسکلت سلولی

ملکول‌های اتصال سلولی به اجزاء اسکلت سلولی متصل می‌باشند. اتصال اینتگرین‌ها به میکروفیلامنت‌های اکتین از طریق پروتئین‌های رابط، به همراه علامت‌دهی دو جانبه بین سطح سلولی و هسته می‌باشد. همچنین کدهرین می‌تواند در اتصالات چسبنده به اکتین متصل شده، منجر به تغییراتی در شکل سلولی شود. همچنین دسموزوم‌هایی که کدهرین‌ها را به کار می‌برند از طریق یک صفحه بین سلولی به فیلامنت‌های حد واسط [در این مورد کراتین‌های سلولی (cytokeratins)] متصل می‌شوند، اما هنوز مشخص نشده است که این اتصال صرفاً یک ترکیب ساختمانی بوده و یا یک ظرفیت علامت‌دهی دارد. فیلامنت‌های حد واسط برای دودمان‌های سلولی اختصاصی می‌باشد و می‌توان از آنها برای تعیین هویت آنها استفاده کرد. میکروتوبول‌ها جزء سوم اسکلت سلولی می‌باشند؛ به نظر می‌رسد نقش آنها بیشتر در ارتباط با حرکت سلولی و در تبادل درون سلولی ریزاندام‌ها از قبیل میتوکندری‌ها و کروماتیدها در تقسیم سلولی باشد.

جنبش سلولی

با ثبت تاخیر زمانی (time lapse recording) نشان داده شده که سلول‌های کشت یافته قادرند بر روی بستر حرکت کنند. پر تحرک‌ترین سلول‌ها، فیبروبلاست‌ها در دانسیته سلولی پایین (وقتی که سلول‌ها در تماس با یکدیگر نمی‌باشند) و کم تحرک‌ترین سلول‌ها تک لایه‌های اپی تلیال متراکم می‌باشند. فیبروبلاست‌ها به صورت سلول‌های منفرد در یک جهت مشخص مهاجرت می‌کنند. یک lamellipodium که در اثر پلیمریزاسیون اکتین تولید می‌شود، در جهت حرکت توسعه یافته و به بستر می‌چسبد و غشاء پلاسمایی در طرف مخالف جمع شده و باعث حرکت جهت‌دار سلول می‌شود. اگر سلول با یک سلول دیگر برخورد کند، قطبیت معکوس شده و به سمت مخالف حرکت می‌کند. همانگونه که با ردیابی توسط طلا مشخص شده است مهاجرت در مسیرهای غیرقابل پیش‌بینی صورت می گیرد تا زمانی که دانسیته سلولی به تراکم می‌رسد که پس از آن مهاجرت جهت‌دار متوقف می‌شود. توقف حرکت در حالت تراکم که همراه با کاهش در چین‌خوردگی (ruffling) غشاء پلاسمایی می‌باشد، به عنوان ممانعت تماسی (contact inhibition) شناخته می‌شود و در نهایت منجر به کناره‌گیری سلول از چرخه تقسیم می‌شود. سلول‌های میوبلاست و اندوتلیال هم به همین صورت مهاجرت کرده و ممکن است شبیه فیبروبلاست‌ها، وقتی به حالت تراکم می‌رسند، تمایز یابند.

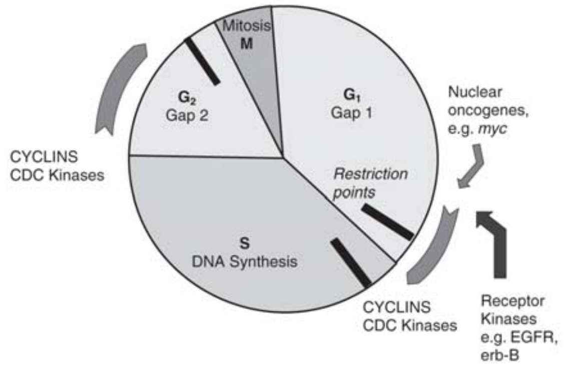
اگر سلول‌های اپی‌تلیال ترانسفورم نشوند، مهاجرت تصادفی به صورت سلول‌های منفرد قطبی را نشان نمی‌دهند. وقتی در

دانسیته سلولی پایین بذرافشانی می‌شوند، مهاجرت کرده تا این که با سلول دیگر برخورد کنند و مهاجرت متوقف شود. در نهایت سلول‌ها به صورت قطعاتی (patches) تجمع یافته و ممکن است کل قطعه علایم حرکت هماهنگ را نشان دهد.

تکثیر سلولی

چرخه سلولی

چرخه سلولی شامل چهار فاز می‌باشد. در فاز M(M=mitosis)، کروماتین به صورت کروموزوم‌ها متراکم می‌شود و دو کروماتید اختصاصی تشکیل دهنده کروموزوم، در هر سلول دختری جدا می‌شوند. در فاز G_1(Gap1) سلول به سمت ساخت DNA و چرخه تقسیم پیش رفته و یا به صورت برگشت‌پذیر (G_0) یا غیرقابل برگشت از چرخه سلولی خارج می شود تا وارد مرحله تمایز شود. در طی G_1 می‌باشد که سلول بخصوص نسبت به کنترل پیشرفت چرخه سلولی در تعدادی از نقاط جدایی (restriction points)حساس می‌باشد و این نقاط مشخص خواهند کرد که آیا سلول مجدداً وارد چرخه شود، از آن کناره‌گیری کند و یا تمایز یابد. بعد از فاز G_1، فاز S (سنتز DNA) می‌باشد که در آن DNA همانندسازی می‌شود. بعد از فاز S فاز G_2 (Gap_2) می‌باشد که در آن سلول برای ورود مجدد به میتوز آماده می‌شود. نقاط کنترل (check points) در شروع ساخت DNA و در G_2، تعیین کننده حفظ ساختار DNA بوده و چرخه سلولی را متوقف کرده تا ترمیم DNA و یا در صورتی که امکان ترمیم وجود نداشته باشد، ورود به آپوپتوزیس امکان‌پذیر باشد. آپوپتوزیس یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، یک فرایند فیزیولوژیکی تنظیم شده می‌باشد که می‌تواند سلول را از جمعیت حذف کند. این فرایند با قطعه قطعه شدن DNA، حباب‌دار شدن (blebbing) هسته و چروکیده شدن سلول همراه بوده و همچنین آپوپتوزیس را می توان توسط تعدادی از آنزیم‌های نشانگر با استفاده از کیت‌هایی از قبیل Apotag یا آزمون COMET تشخیص داد.



شکل ۳-۲: چرخه سلولی. چرخه سلولی به چهار فازG_1، S، G_2و M تقسیم می شود. با برهمکنش سیکلین ها با CDC کینازها چرخه به جلو رانده می شود و با ژن های سرطانزای هسته و سیگنال های سیتوپلاسمی حاصل از برهمکنش گیرنده کیناز با لیگاند تحریک می شود. چرخه سلولی در نقاط محدود کننده توسط بازدارنده های چرخه سلولی از قبیل Rb و p53 متوقف می شود.

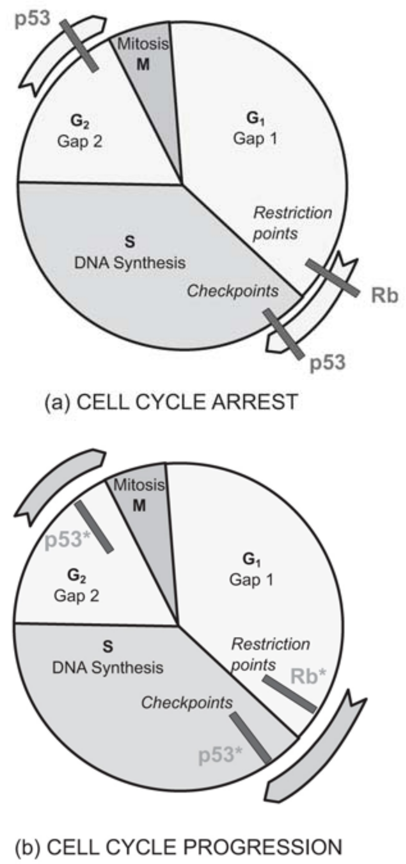
کنترل تکثیر سلولی

ورود به چرخه سلولی توسط علایم محیطی تنظیم می‌شود. در دانسیته‌های سلولی پایین، اطراف سلول‌ها خالی بوده و بنابراین سلول‌ها را قادر به گسترش یافتن می‌سازد که در حضور عوامل رشد میتوژن از قبیل فاکتور رشد فیبروبلاست (FGF_s) یا فاکتور رشد مشتق از پلاکت‌ها (PDGF) که با گیرنده‌های سطح سلولی برهمکنش دارند، امکان ورود آنها به داخل چرخه فراهم می‌شود. دانسیته‌های سلولی بالا از تکثیر سلول‌های طبیعی ممانعت می‌کند. ممانعت از تکثیر با تماس سلولی شروع شده و با ازدحام سلول‌ها و تغییر شکل سلولی ناشی از آن، افزایش یافته و باعث کاهش گسترش سلول‌ها می‌شود.

کنترل داخل سلولی توسط فاکتورهای عمل کننده مثبت (positive acting factors) از قبیل سیکلین‌ها (cyclins) در زمان اتصال به فاکتور رشد توسط آبشارهای انتقال پیام (signal transduction cascades) فعال شونده توسط فسفریلاسیون بخش داخلی گیرنده، تنظیم می‌شود. فاکتورهای عمل کننده منفی مثل p53، p16 یا محصول ژن Rb از پیشرفت چرخه سلولی در نقاط محدود کننده (restriction points) یا نقاط کنترلی ممانعت می‌کنند. ارتباط بین اجزاء کنترل خارج سلولی (هم عمل کننده های مثبت مثل PDGF و هم عمل کننده های منفی مثل TGF-β) و عمل کننده های داخل سلولی، توسط گیرنده‌های غشاء سلولی ایجاد شده و مسیرهای انتقال سیگنال، اغلب شامل فسفوریلاسیون پروتئین و پیامبرهای ثانویه از قبیل آدنوزین مونوفسفات حلقه‌ای (cAMP)، Ca^{2+} و دی آسیل گلیسرول می‌باشد. اغلب شواهد در مورد حضور این مراحل در کنترل تکثیر سلولی از مطالعات بیان ژن انکوژن و بازدارنده در سلول‌های توموری با هدف نهایی تنظیم درمانی تکثیر سلولی کنترل نشده در سرطان بدست آمده است.

تمایز

اغلب بیان ویژگی‌های تمایز یافته در کشت سلولی با پیشرفت تکثیر سلولی که برای تکثیر رده سلولی و افزایش استوک‌ها لازم است، محدود می‌شود. شرایط لازم برای القاء



شکل ۴-۲: ممانعت و پیشرفت چرخه سلولی. چرخه سلولی در نقاط محدود کننده یا نقاط کنترل با فعالیت Rb و p53 و بازدارنده های دیگر چرخه سلولی ممانعت می شود. (a) وقتی که اینها غیر فعال می شوند، معمولاً با فسفوریله شدن، چرخه سلولی ادامه می یابد.

تمایز ـ یک دانسیته سلولی بالا، برهمکنش سلول ـ سلول و سلول ـ ماتریکس و حضور فاکتورهای تمایز مختلف، ممکن است اغلب ممانعت کننده تکثیر سلولی باشد و برعکس. بنابراین اگر تمایز مورد نظر باشد، ممکن است نیاز باشد تا دو سری مجزا از شرایط یکی برای بهینه کردن تکثیر سلولی و دیگری برای بهینه کردن تمایز سلولی تعریف شود.

حفظ تمایز

برای سالیان درازی مشخص شده بود که مانند کشت اندام، وقتی ساختمان سه بعدی بافت مجدداً بوجود آید، عملکردهای اختصاصی دوباره باز خواهد گشت. متاسفانه کشت‌های اندام را نمی‌توان تکثیر کرد و باید برای هر آزمایش مجدداً تهیه شوند و تعیین کمیت آنها نسبت به کشت‌های سلولی مشکل‌تر است. به همین دلیل محققان زیادی با تزریق (perfusion) کشت‌های تک لایه برای تولید مجدد اجزاء محیط *in vivo*، با کشت سلول‌ها روی یا درون ماتریکس‌های مخصوص مثل ژل کلاژن، سلولز یا اسفنج ژلاتین یا ماتریکس‌های دیگر تلاش کرده‌اند.

شروع کشت

به طور خلاصه، یک کشت یا با رشد سلول‌ها انتقال یافته از یک تکه بافت و یا با خرد کردن مکانیکی بافت حاصل می‌شود. صرف نظر از اینکه از کدام روش برای جداسازی استفاده کنیم، کشت سلولی مجموعه ای از فرایند های انتخابی است که ممکن است منحصراً منجر به ایجاد یک رده سلولی خاص شود. در کشت بافت، انتخاب به واسطه توانایی سلول‌ها برای انتقال از بافت بوده در حالیکه در مورد سلول‌های پراکنده، فقط سلول‌هایی که هم زنده مانده و هم به بستر می‌چسبند و یا در حالت سوسپانسیون زنده می‌مانند، اساس یک کشت اولیه را تشکیل خواهند داد.

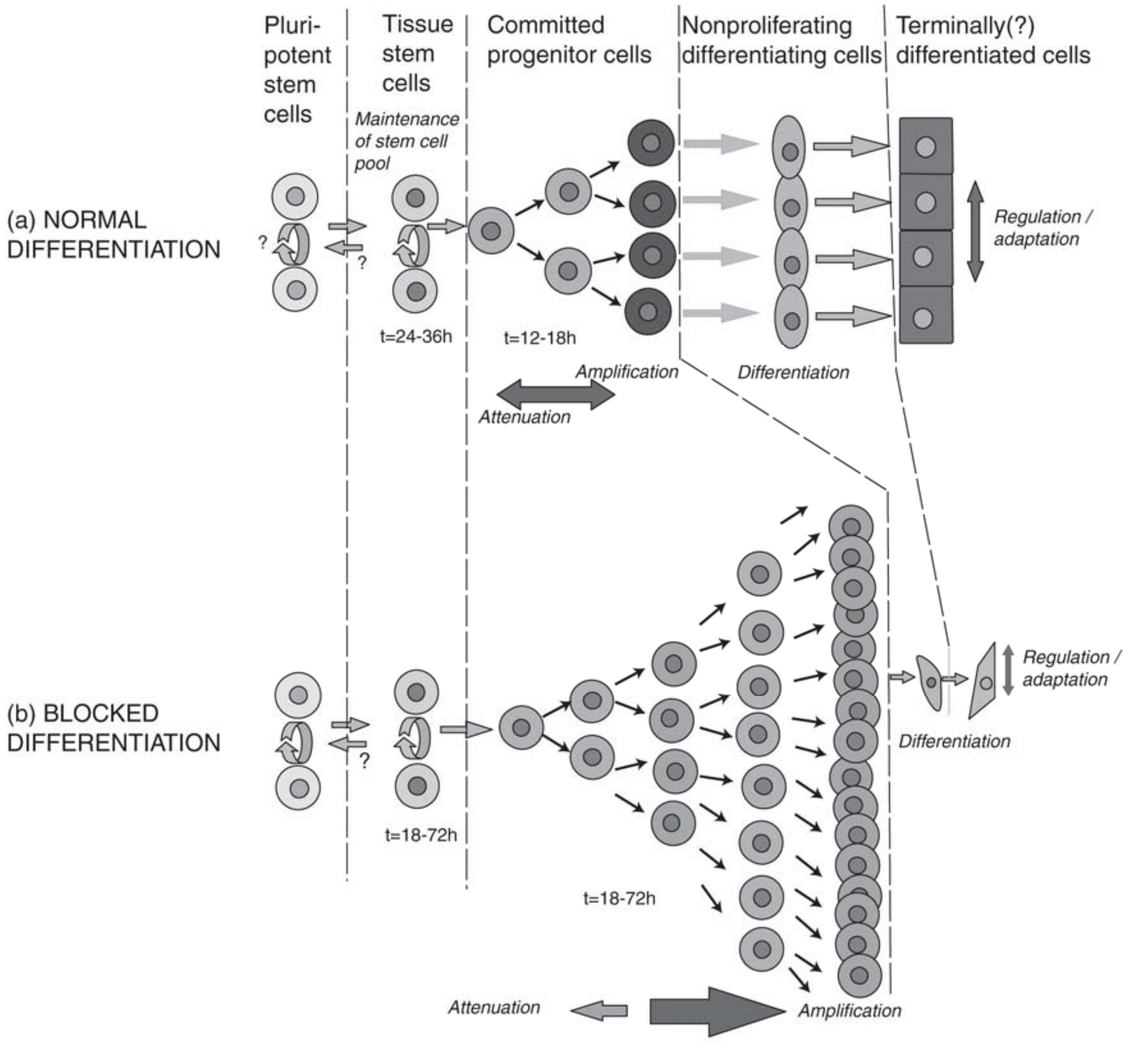
اگر کشت اولیه برای بیش از چند ساعت حفظ شود، مرحله انتخابی بعدی رخ خواهد داد. سلول‌هایی که قادر به تکثیر هستند، افزایش یافته، برخی انواع سلولی زنده مانده اما افزایش نمی‌یابند و باقیمانده سلول‌ها قادر به زنده ماندن تحت شرایط خاص رشد نخواهند بود. بنابراین قسمتی از سلول‌ها تغییر یافته و شروع به رشد خواهند کرد تا این که در مورد کشت‌های تک لایه تمام بستر کشت موجود اشغال شود.

پس از رسیدن به حالت تراکم (یعنی همه ناحیه رشد موجود استفاده شده و سلول‌ها تماس نزدیکی با یکدیگر برقرار کردند) تقسیم سلول‌هایی که رشد آنها به ممانعت تماسی و محدودیت دانسیته حساس می‌باشد متوقف شده در حالی که در مورد سلول‌های ترانسفورم شده که به محدودیت دانسیته حساس نمی‌باشند، باعث رشد بیش از حد خواهد شد. حفظ دانسیته سلولی به میزان کم (مثلاً با واکشت متناوب)، در کشت‌هایی از قبیل فیبروبلاست‌های موشی که در آن ترانسفورماسیون‌های خود به خودی منجر به رشد بیش از حد با دانسیته‌های سلولی بالا می‌شود، به حفظ فنوتیپ طبیعی کمک می‌کند.

بعضی از جنبه‌های عملکرد اختصاصی، در کشت اولیه، بخصوص زمانی که کشت به تراکم می‌رسد به صورت قوی‌تر بیان می‌شود. در این مرحله کشت بیشترین شباهت ریخت‌شناسی را با بافت والد نشان می دهد و مقداری تنوع سلولی ایجاد می شود.

تکامل رده‌های سلولی

کشت اولیه بعد از اولین واکشت یا پاساژ، به عنوان یک رده سلولی شناخته شده و ممکن است چندین بار تکثیر و واکشت شود. در هر واکشت متوالی سلول‌هایی که دارای توانایی تکثیر سریع‌تر می‌باشند به تدریج غالب شده و سلول‌های غیرتکثیر شونده و یا سلول‌هایی که آهسته تکثیر می‌شوند، رقیق خواهند



شکل ۵-۲: تمایز از سلولهای بنیادی. (a) در *in vivo*، یک منبع کوچک سلول بنیادی به یک قسمت پیش ساز در حال تکثیر تبدیل شده که منبع سلول تمایز یافته را تولید می کند. (b) در *in vivo*، تمایز به دلیل نیاز به تکثیر، محدود بوده و جمعیت به طور برجسته سلولهای پیش ساز می شوند، هرچند که ممکن است سلولهای بنیادی هم وجود داشته باشند. سلولهای بنیادی پرتوان هم از بعضی بافت ها کشت داده شده اند اما ارتباط آنها با سلولهای بنیادی بافت هنوز نامشخص می باشد.

شد. این امر بخصوص بعد از اولین واکشت کاملاً آشکار می‌شود که تفاوت در ظرفیت تکثیر به قابلیت‌های مختلف برای مقاومت در برابر آسیب ناشی از تریپسینه کردن و انتقال افزوده می‌شود. هر چند بعضی از انتخاب ها و تغییرات فنوتیپی ادامه خواهد یافت، اما از کشت سوم کشت پایدارتر شده و با سلولهایی که قوی‌تر و سریع‌تر تقسیم می شوند، مشخص می شود. اغلب در حضور سرم و بدون شرایط انتخابی خاص، سلول‌های مزانشیمال حاصل از فیبروبلاست‌های بافت همبند یا اجزاء عروقی به میزان زیادی رشد می‌کنند. هر چند که این امر منجر به ایجاد تعدادی از رده‌های سلولی بسیار مفید شده است (مثل فیبروبلاست‌های ریه جنین انسان WI38، فیبروبلاست‌های کلیه نوزاد هامستر BHK21، سلول‌های COS، سلول‌های CHO و شاید مشهورترین آنها سلول L، فیبروبلاست زیرجلدی موشی که با methyl cholanthrene تیمار شده است). این رشد بیش از حد از آغاز یکی از چالش‌های بزرگ کشت بافت بوده است یعنی چگونه از رشد بیش از حد یا رشد کند سلول‌های تخصصی حساس‌تر مثل پارانشیم کبدی یا کراتینوسیت‌های اپیدرمی جلوگیری شود.

جدول ۱-۲: رده های سلولی دارای ویژگیهای تمایز یافته

Cell type	Origin	Cell line	N*	Species	Marker	Reference
Endocrine	Adrenal cortex	Y-1	T	Mouse	Adrenal steroids	Yasamura et al., 1966
Endocrine	Pituitary tumor	GH3	T	Rat	Growth hormone	Buonassisi et al., 1962
Endocrine	Hypothalamus	C7	N	Mouse	Neurophysin; vasopressin	De Vitry et al., 1974
Endothelium	Dermis	HDMEC		Human	Factor VIII, CD36	Gupta et al., 1997
Endothelium	Pulmonary artery	CPAE	C	Cow	Factor VIII, angiotensin II-converting enzyme	Del Vecchio & Smith, 1981
Endothelium	Hepatoma	SK/HEP-1	T	Human	Factor VIII	Heffelfinger et al., 1992
Epithelium	Prostate	PPEC	N	Human	PSA	Robertson & Robertson, 1995
Epithelium	Kidney	MDCK	C	Dog	Domes, transport	Gaush et al., 1966; Rindler et al., 1979
Epithelium	Kidney	LLC–PKI	C	Pig	Na^+-dependent glucose uptake	Hull et al., 1976; Saier, 1984
Epithelium	Breast	MCF-7	T	Human	Domes, α-lactalbumin	Soule et al., 1973
Glia	Glioma	MOG–G-CCM	T	Human	Glutamyl synthetase	Balmforth et al., 1986
Glia	Glioma	C6	T	Rat	Glial fibrillary acidic protein, GPDH	Benda et al., 1968
Hepatocytes	Hepatoma	H4–11–E–C3	T	Rat	Tyrosine aminotransferase	Pitot et al., 1964
Hepatocytes	Liver		T	Mouse	Aminotransferase	Yeoh et al., 1990
Keratinocytes	Epidermis	HaCaT	C	Human	Cornification	Boukamp et al., 1988
Leukemia	Spleen	Friend	T	Mouse	Hemoglobin	Scher et al., 1971
Melanocytes	Melanoma	B16	T	Mouse	Melanin	Nilos & Makarski, 1978
Myeloid	Leukemia	K562	T	Human	Hemoglobin	Andersson et al., 1979a, b
Myeloid	Myeloma	Various	T	Mouse	Immunoglobulin	Horibata & Harris, 1970
Myeloid	Marrow	WEHI–3B D+	T	Mouse	Morphology	Nicola, 1987
Myeloid	Leukemia	HL60	T	Human	Phagocytosis; Neotetrazolium Blue reduction	Olsson & Ologsson, 1981
Myocytes	Skeletal muscle	C2	C	Mouse	Myotubes	Morgan et al., 1992
		L6	C	Rat	Myotubes	Richler & Yaffe, 1970
Neuroendocrine	Pheochromocytoma	PC12	T	Rat	Catecholamines; dopamine; norepinephrine	Greene & Tischler, 1976
Neurons	Neuroblastoma	C1300	T	Rat	Neurites	Lieberman & Sachs, 1978
Type II pneumocyte or Clara cell	Lung carcinoma	A549	T	Human	Surfactant	Giard et al., 1972
		NCI-H441	T	Human	Surfactant	Brower et al., 1986
Type II pneumocyte	Lung carcinoma		I	Mouse	Surfactant	Wilkenheiser et al., 1991
Various	Embryonal teratocarcinoma	F9	T	Mouse	PA, laminin, type IV collagen	Bernstine et al., 1973

*Normal (N), continuous (C), immortalized (I), transformed (T).

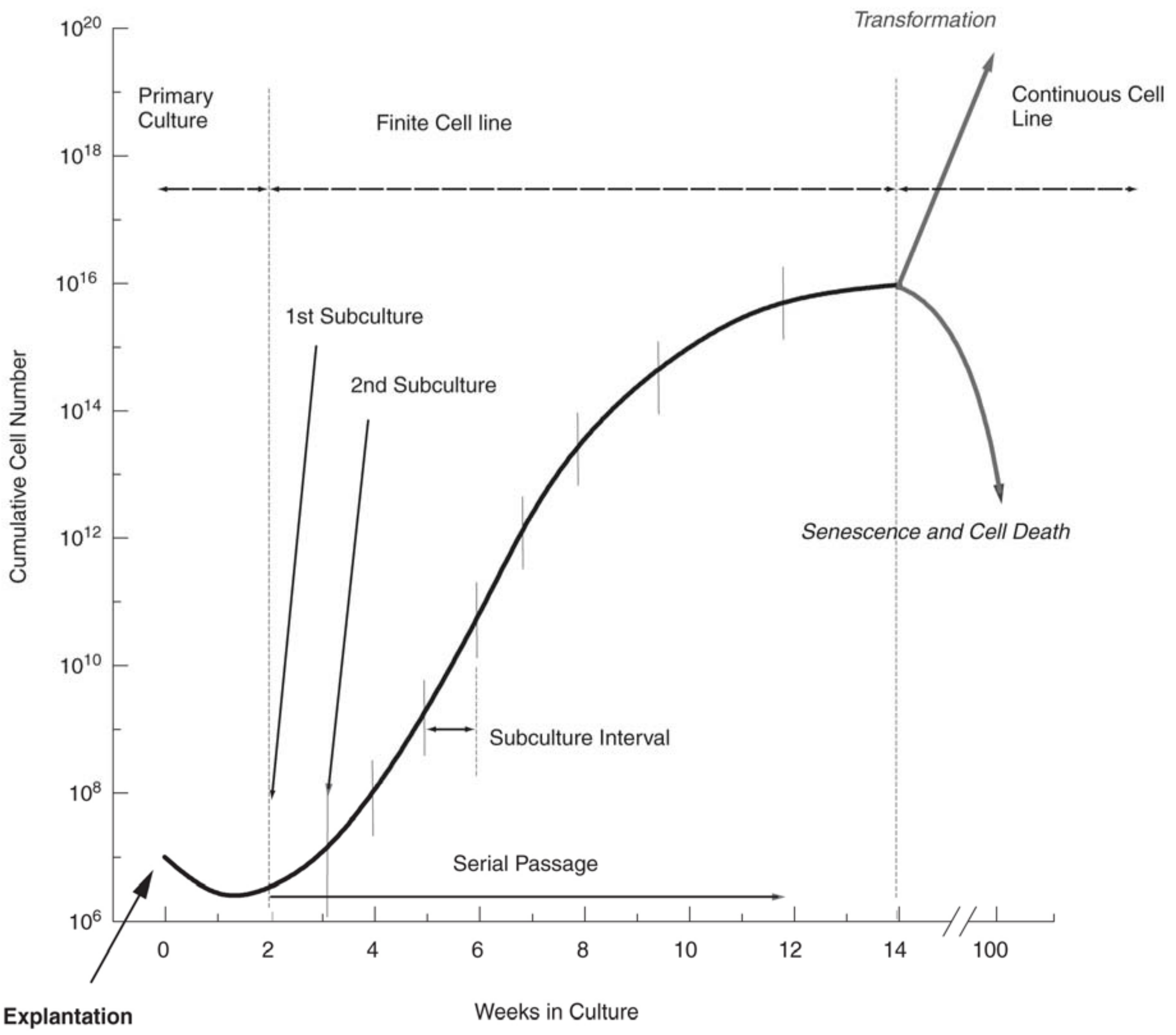
نامناسب بودن شرایط کشت به میزان زیادی دلیل این مشکل می‌باشد و اکنون پیشرفت قابل توجهی در استفاده از محیط‌های کشت و بسترهای انتخابی برای نگهداری بسیاری از رده‌های سلولی تخصصی ایجاد شده است.

پیرشدگی

سلول‌های طبیعی قادرند فقط به تعداد دفعات محدود تقسیم شوند، بنابراین رده‌های سلولی که از بافت طبیعی منشاء گرفته‌اند، پس از تعداد مشخص دو برابر شدن جمعیت، خواهند مرد. این یک پدیده ژنتیکی می‌باشد که تحت کنترل چند ژن است و به عنوان پیرشدگی شناخته می‌شود و گمان می‌رود به دلیل ناتوانی توالی‌های پایانی DNA در تلومرها برای همانندسازی در هر تقسیم سلولی باشد. حاصل آن یک کوتاه شدگی در حال پیشرفت درتلومرها می‌باشد، تا نهایتاً سلول دیگر قادر به تقسیم بیشتر نباشد. سلول‌های زاینده (germ cells)، سلول‌های بنیادی و سلول‌های ترانسفورم شده که قادر به همانند سازی توالی‌های انتهایی DNA در تلومر بوده از این قاعده مستثنی می‌باشند.

تکامل رده‌های سلولی پیوسته

بعضی از رده‌های سلولی ممکن است به رده‌های سلولی پیوسته تبدیل شوند. توانایی یک رده سلولی برای رشد پیوسته،



شکل ۶-۲: تکامل یک رده سلولی. محور عمودی (Y) رشد سلولی کلی را برای یک کشت سلولی فرضی نمایش می دهد(به فرض این که در پاساژ هیچ گونه کاهشی وجود نداشته باشد). تعداد سلولی کل(راندمان سلولی) بر روی این محور در مقیاس لگاریتمی نشان داده شده و زمان کشت بر روی محور X در مقیاس خطی نشان داده شده است. هر چند یک رده سلولی پیوسته در مدت ۱۴ هفته نشان داده شده اما برای سلولهای مختلف می تواند زمان های متفاوتی باشد. همچنین پیری ممکن است در هر زمانی رخ دهد اما برای فیبروبلاست های دیپلوئید انسانی با توجه به زمان دو برابر شدن، به احتمال زیاد بین ۳۰ و ۶۰ دو برابر شدن سلول اتفاق می افتد.

احتمالاً منعکس کننده استعداد آن برای تغییر ژنتیکی بوده که امکان انتخاب بعدی را فراهم می‌سازد. تغییرات ژنتیکی معمولاً شامل حذف یا موتاسیون ژن p53 می‌باشد که به طور معمول از پیشرفت چرخه سلولی جلوگیری می‌کند، در حالیکه اگر موتاسیون روی دهد، افزایش بیان ژن تلومراز را خواهیم داشت.

معمولاً فیبروبلاست‌های انسانی در کل دوره زندگی در کشت به صورت یوپلوئید (euploid) باقی مانده و هرگز به رده‌های سلولی پیوسته تبدیل نمی‌شوند، در حالی که اغلب فیبروبلاست‌های موشی و کشت‌های سلولی انواع تومورهای انسانی و حیوانی در کشت آنوپلوئید (aneuploid) شده و اغلب به کشت‌های پیوسته تبدیل می‌شوند. احتمالاً شرایطی که بیشتر سلولها را برای تکامل یک رده سلولی پیوسته مستعد می کند، تنوع ژنتیکی است. بنابراین تعجب آور نیست که ناپایداری ژنتیکی همیشه در رده های سلولی پیوسته وجود داشته باشد. یک ویژگی مشترک بسیاری از رده‌های سلولی پیوسته انسان، تکامل یک تعداد کروموزومی ساب تراپلوئید

(subtetraploid) می‌باشد. تغییر در یک کشت که منجر به تولید یک رده سلولی پیوسته می‌شود، معمولاً ترانسفورماسیون در *in vitro* نامیده می‌شود و ممکن است به طور خودبه‌خودی ایجاد شده و یا با القاء شیمیایی یا ویروسی باشد. واژه ترانسفورماسیون نسبتاً به صورت نادرست استفاده شده و ممکن است برای افراد مختلف معانی مختلفی داشته باشد. دراین کتاب جاودان سازی (immortalization) به معنی به دست آوردن یک طول عمر نامحدود می‌باشد و ترانسفورماسیون به یک تغییر اضافی در ویژگی‌های رشد (غیر وابستگی به تکیه‌گاه، از دست دادن ممانعت تماسی و محدودیت دانسیته رشد) دلالت دارد که اغلب اما نه همیشه، با تومورزایی همراه است.

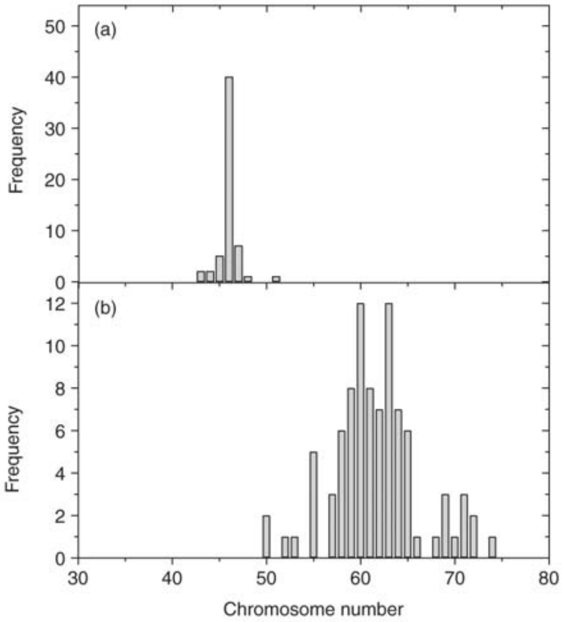
معمولاً رده‌های سلولی پیوسته آنوپلوئید بوده و اغلب تعداد کروموزوم آنها مابین دیپلوئید و تتراپلوئید می‌باشد. همچنین تغییرات قابل توجهی در تعداد و ساختمان کروموزوم در میان سلول‌های یک جمعیت وجود دارد (هتروپلوئیدی). مشخص نیست که آیا سلول‌هایی که به رده‌های سلولی پیوسته تبدیل می‌شوند به تعداد بسیار کم در اکسپلنت وجود داشته یا بعداً در نتیجه ترانسفورماسیون یک یا تعداد بیشتری از سلول‌ها حاصل می‌شوند. به نظر می‌رسد فرضیه دوم در زمینه کینتیک سلولی بیشتر محتمل باشد.

واژه ترانسفورماسیون تا حدودی به دلیل این که کشت تغییرات مورفولوژیکی و کینتیکی را طی کرده و همچنین به دلیل این که اغلب تشکیل یک رده سلولی پیوسته همراه با یک افزایش در تومورزایی (tumorigenicity) می‌باشد برای فرایند تشکیل یک رده سلولی پیوسته به کار می‌رفته است. تعدادی از خصوصیات رده‌های سلولی پیوسته از قبیل کاهش نیاز به سرم، کاهش محدودیت دانسیته رشد، رشد در محیط‌های کشت نیمه جامد، آنوپلوئیدی و ویژگی‌های دیگر مربوط به ترانسفورماسیون بدخیم می‌باشد. همچنین در سلول‌هایی که ترانسفورماسیون القا شده با مواد شیمیایی یا ویروس‌ها را طی کرده‌اند تغییرات مورفولوژیکی و رفتاری مشابهی را می‌توان مشاهده کرد.

بیشتر سلول‌های طبیعی به رده‌های سلولی پیوسته تبدیل نمی‌شوند. به عنوان مثال فیبروبلاست‌های انسانی نرمال در طی کل طول عمر یوپلوئید باقی مانده و در بحران (crisis) (معمولاً بعد از حدود ۵۰ نسل) تقسیم شدن متوقف می‌شود، هر چند ممکن است این سلول‌ها تا ۱۸ ماه پس از آن زنده باقی بمانند. گلیا انسانی و فیبروبلاست‌های جوجه هم به همین طریق رفتار می‌کنند. از سوی دیگر بهبود تکنیک‌های کشت باعث افزایش تدریجی طول عمر سلول‌های اپیدرمی شده است و ممکن است هنوز قادر به رشد پیوسته باشند. چنین رشدی ممکن است به دلیل ظرفیت خود نوسازی (self-renewal) بافت در *in vivo* باشد. همچنین کشت پیوسته سلول‌های لنفوبلاست با ترانسفورماسیون توسط ویروس Epstein-Barr امکان‌پذیر است.

منشاء سلول‌های کشت یافته

چون بسیاری از افراد تحت شرایط استاندارد با رده‌های سلولی متناهی یا در حال تکثیر پیوسته کار می‌کنند، در نظر گرفتن ترکیب سلولی کشت مهم می‌باشد. ظرفیت بیان نشانگرهای تمایز یافته، تحت تاثیر شرایط القایی ممکن است نشان دهنده این باشد که سلول‌های کشت داده شده بالغ بوده و فقط برای ادامه ساخت پروتئین‌های اختصاصی به القاء نیاز داشته و یا این که کشت از سلول‌های پیش‌ساز یا بنیادی تشکیل شده که قادر به تکثیر بوده اما تا زمانی که شرایط القاء مناسب فراهم شود به صورت غیرتمایز یافته باقی می‌مانند که پس از القاء تعدادی از سلول‌ها و یا همه آنها بالغ شده و تمایز یافته می‌شوند. ممکن است در نظر گرفتن این که یک کشت سلولی در تعادل بین سلول‌های بنیادی چند توان (multipotent)، سلول‌های پیش‌ساز غیرتمایز یافته اما متعهد شده (committed) و سلول‌های بالغ تمایز یافته می‌باشد و فرض این که ممکن است این تعادل بر حسب شرایط محیطی تغییر کند، مفید باشد. پاساژ مکرر در دانسیته‌های سلولی نسبتاً پایین، تکثیر سلولی را افزایش داده و تمایز را محدود می‌سازد، در حالی که دانسیته‌های سلولی بالا، سرم کم و هورمون‌های مناسب تمایز را زیاد کرده و از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند.



شکل ۷-۲: تعداد کروموزومی. رده های سلولی متناهی و پیوسته. (a) یک رده سلولی گلیال انسانی نرمال. (b) یک رده سلولی پیوسته از ملانومای متاستاتیک انسانی.

منشاء کشت تعیین کننده این خواهد بود که کدام اجزاء سلولی ممکن است حضور داشته باشند. بنابراین، رده‌های سلولی که از رویان منشاء گرفته‌اند، ممکن است حاوی تعداد بیشتری سلول‌های بنیادی و سلول‌های پیش‌ساز باشند و در مقایسه با کشت مربوط به افراد بالغ دارای ظرفیت خودنوسازی بیشتری می‌باشند. به علاوه کشت بافت‌هایی که در *in vivo* به صورت پیوسته خودنوسازی را انجام می‌دهند (اپی‌درم، اپی‌تلیوم روده، سلول‌های خونساز) ممکن است هنوز حاوی سلول‌های بنیادی باشند که تحت شرایط مناسب دارای یک طول عمر طولانی می‌باشند، در حالی که کشت بافت‌هایی که فقط تحت فشار نوسازی می‌شوند (فیبروبلاست‌ها، عضله، گلیا) ممکن است فقط حاوی سلول‌های پیش‌ساز متعهد با یک طول عمر محدود باشند. بنابراین ماهیت سلول کشت یافته نه تنها توسط دودمان آن سلول در *in vivo* (سلول خونساز، سلول کبدی، گلیا و غیره) بلکه همچنین توسط موقعیت آن سلول در آن دودمان (سلول بنیادی، سلول پیش‌ساز متعهد یا سلول تمایز یافته بالغ) مشخص می‌شود.

وقتی که سلول‌ها از یک نئوپلاسم (neoplasm) کشت داده می‌شوند، لازم نیست که از این قوانین پیروی کنند. بنابراین ممکن است یک هپاتوما از رت در *in vitro* تکثیر شده و هنوز هم مقداری از خصوصیات تمایز یافته را بیان کند، اما هر چقدر به فنوتیپ طبیعی نزدیک‌تر باشند، ممکن است القاء بیشتر تمایز از تکثیر ممانعت کند. هر چند رابطه بین موقعیت در دودمان و تکثیر سلولی ممکن است سست شود، انتقال بین دودمان‌ها هنوز به طور کامل ثابت نشده است.

فصل سوم

تجهیزات

نیازهای یک آزمایشگاه کشت بافت

در صورت محدود بودن منابع مالی موجود، لازم است که اولویت به نیازهای خاص یک آزمایشگاه کشت بافت داده شود. شبیه اکثر آزمایشگاههای دیگر، نیازهای ویژه یک آزمایشگاه کشت بافت را می توان در سه دسته قرار داد:

۱) ضروری – شما بدون آنها قادر به انجام کشت بافت به صورت مطمئن نمی باشید؛

۲) سودمند(benefical) – کار بهتر، با کارایی بیشتر، سریعتر یا با زحمت کمتر انجام می گیرد؛

۳) مفید(useful) – وسایلی که شرایط کارکردن را بهبود می بخشند، خستگی را کاهش داده یا بطور کلی محیط کار شما را جذاب تر می کنند.

ناحیه آسپتیک(aseptic area)

هود لامینار فلو(Laminar- Flow Hood)

در صورت وجود مکان تمیز و ایزوله با دسترسی محدود، امکان انجام کارهای آسپتیک بدون هود لامینار فلو وجود دارد. هر چند آشکار است که در اغلب آزمایشگاههایی که به طورمعمول شلوغ و پر ازدحام می باشند، ساده ترین راه برای ایجاد شرایط آسپتیک، استفاده از یک هودلامینار فلو می باشد. معمولاً یک هود برای کار کردن دو یا سه نفر کافی می باشد. در واقع هود لامینارفلو جزء مهمترین وسایل آزمایشگاه کشت سلولی می باشد، زیرا در صورتیکه به درستی استفاده شود، یک محیط کار تمیز و عاری از آلودگی را فراهم ساخته و باعث محافظت از کاربر در برابر ذرات آئروسل می گردد. در این هودها هوا از طریق یک فیلتر (High Efficieney Particulate Air) HEPA عبور کرده و بعد از گرفته شدن ذرات و میکروارگانیسم های موجود در آن وارد اتاقک شده و از ورود هوای آلوده به اتاقک جلوگیری می شود. به طور کلی سه نوع هود لامینارفلو وجود دارد. سطح محدود کنندگی فراهم شده بر حسب کلاس هود متفاوت می باشد.

یک هود با جریان افقی(Horizontal Flow Hood) ارزانتر بوده و بهترین شرایط استریل را برای کشت های شما فراهم می سازد، اما در واقع فقط برای تهیه محیط های کشت و معرفهای استریل و برای کشت دادن سلولهای غیر نخستیان(nonprimate) مناسب است. همچنین این نوع هود مخصوصاً برای تشریح کردن اندامهای غیر نخستیان قبل از کشت اولیه مناسب می باشد. برای موادی که دارای خطر بالقوه می باشند(هر نوع نخستیان، شامل انسان، رده های سلولی، کشت های تولیدکننده ویروس، رادیوایزوتوپ ها یا داروهای سرطانزا یا سمی) باید از هود کلاس II یا کلاس III استفاده شود.

معیارهایی را که باید برای انتخاب یک هود مناسب در نظر بگیرید شامل:

۱- به اندازه کافی برای کار کردن یک نفر بزرگ باشد(معمولاً دارای حداقل سطح کار۱۲۰۰mm پهنا × ۶۰۰mm عمق).

۲- بی سر و صدا باشد چون هودهای پر سر و صدا خسته کننده تر می باشند.

۳- به آسانی هم داخل سطح کار و هم زیر سطح کار قابل پاک کردن باشد.

۴- نشستن در کنار آن راحت باشد.

باید صفحه جلویی قابلیت بالا بردن، پائین آوردن و یا برداشتن کامل را داشته باشد تا تمیز کردن و کار با وسایل کشت حجیم تسهیل شود. به خاطر داشته باشید که یک اتاقک مخاطره زیستی (biohazard cabinet) در صورتیکه صفحه جلویی را بردارید باعث حفاظت لازم از کاربر نمی شود.

جدول ۱-۳ : تجهیزات کشت بافت

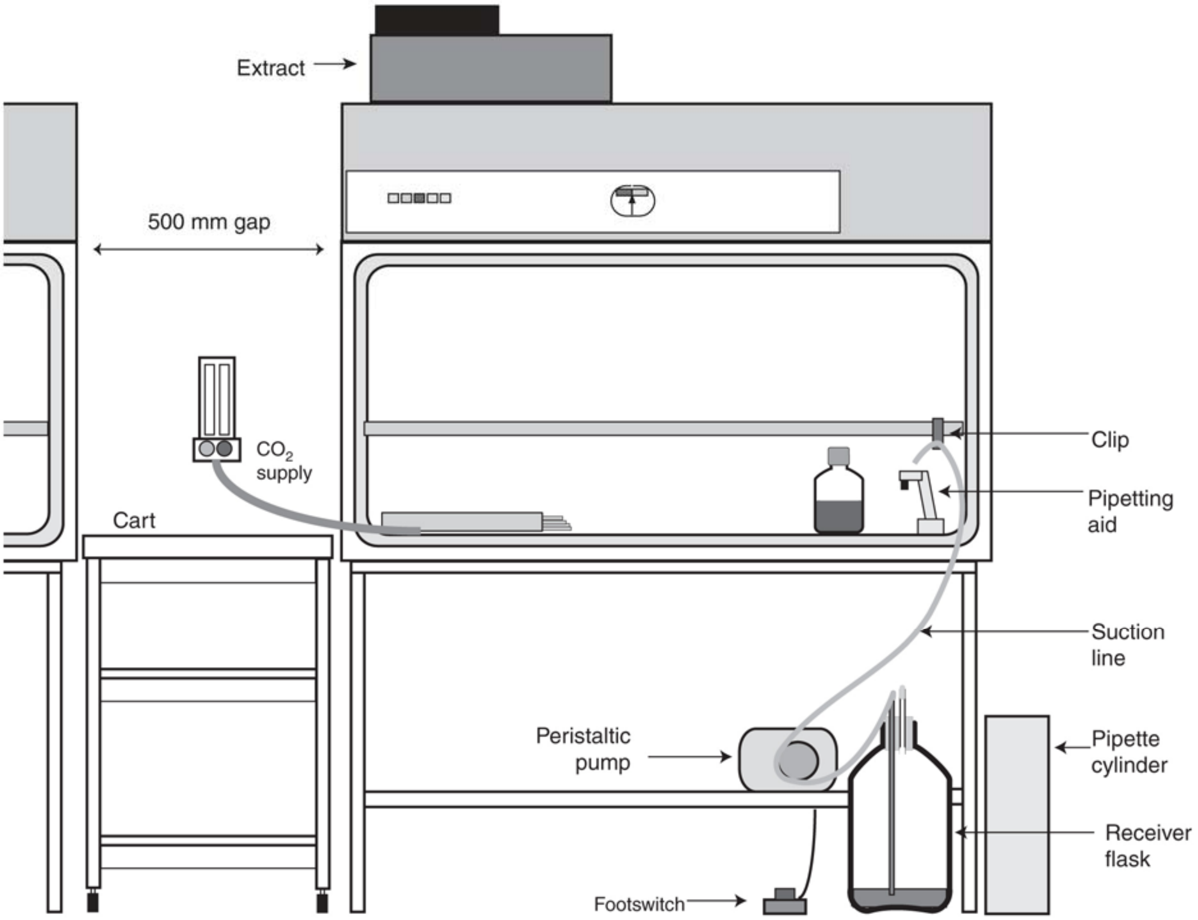
نیازهای اساسی	غیر ضروری اما سودمند	مفید
هود لامینارفلو	دستگاه سلول شمار	ماشین مخصوص شستشوی ظروف شیشه ای
انکوباتور CO_2	پمپ پریستالتیک	فریزر با دمای $-۷۰^\circ C$ و یا کمتر
کپسول CO_2 مایع	سمپلر	دستگاه هدایت سنج
کپسول حاوی CO_2 ٪۵	pH متر	دستگاه اسمز سنج
ترازو	آون	کامپیوتر
اتوکلاو	گرمخانه	دستگاه مخصوص شمارش کلنی
یخچال	ثبت کننده های درجه حرارت	سانتریفوژ با ظرفیت بالا
فریزر $-۲۰^\circ C$	میکروسکوپ فلورسنس فاز کنتراست	پرینتر
میکروسکوپ معکوس	Pipette plugger	دوربین دیجیتال و مانیتور برای میکروسکوپ معکوس
حمام آب	دستگاه خشک کننده پی پت	تجهیزات Time-lapse video
سینک شستشو	توزیع کننده اتوماتیک	دستگاه ثبت درجه حرارت قابل حمل برای چک کردن درجه حرارت گرمخانه یا انکوباتور
سیلندر پی پت	چرخ دستی یا گاری	دستگاه خنک کننده قابل کنترل (برای منجمد کردن سلولها)
شوینده پی پت	آون خشک کننده با درجه حرارت کم و زیاد	Cell sorter فعال شونده با فلورسانس
دستگاه تولید آب مقطر	رک های غلتان برای کشت بطریهای غلتان	میکروسکوپ هم کانون
سانتریفوژ رومیزی	منبع CO_2 لوله کشی شده از مخزن سیلندر	دستگاه مخصوص شمارش سنتیلاسیون پلیت میکروتیتراسیون
تانک ازت مایع (حدود ۳۵ لیتر)		
تانک ذخیره ازت مایع (حدود ۲۵ لیتر)		
وسیله ای برای سرد کردن آهسته سلولهای در حال انجماد		
رک های همزن مغناطیسی برای کشت های سوسپانسیون		
هموسیتومتر		

شخصی که قرار است از هود استفاده کند باید قبل از خریداری به منظور شبیه سازی استفاده معمولی در پشت هود بنشیند. سوالات زیر را در نظر بگیرید:

۱) در حالیکه به راحتی و نزدیک به هود نشسته اید و دستهای شما حداقل تا نیمه داخل هود است آیا قادرید که زانوها را زیر هود قرار دهید؟
۲) آیا یک جا پایی در محل مناسب وجود دارد؟
۳) آیا شما قادرید بدون اینکه به گردنتان فشار آورید کاری را که انجام می دهید، ببینید؟
۴) آیا سطح کار سوراخ دار می باشد و در صورتیکه سوراخ دار است آیا درمورد سرریز مایعات دچار زحمت می شوید؟ (یک سطح کار یکپارچه که در جلو و پشت دارای منفذ می باشد ترجیح داده می شود).
۵) آیا سطح کار را می توان برای تمیز کردن به آسانی جابجا کرد؟
۶) آیا سطوح کار برآمده بوده، دارای لبه های تیز بوده یا لبه های گرد داشته تا در موقع تمیز کردن هود باعث بریدن دست کار بر نشود؟
۷) آیا در سطح کار لوازمی وجود دارد که باعث تجمع آلودگی شود؟

بعضی از اتاقک ها دارای سطوح کار قطعه قطعه بوده که برداشتن و تمیز کردن آنها آسانتر است اما باعث ایجاد فضاهای موئینه می شود.

۸) آیا روشنایی مناسب و به اندازه کافی می باشد؟
۹) آیا شما قادرید هود را در داخل آزمایشگاه کشت بافت قرار دهید؟



شکل ۱-۳: هود لامینار فلو. یک پمپ پریستالتیک متصل به یک مخزن دریافت کننده در قسمت سمت راست و پایین هـود بـا یـک کلید برای فعال کردن پمپ نشان داده شده است. خط مکش پمپ به ناحیه کار هدایت شده و یک لوله از یک مخزن گاز باعث تأمین CO_2 مخلوط با هوا می شود.

۱۰)آیا هـود را مـی تـوان در محـل سـرویس کـرد(از مهنـدس تعمیرات سوال کنید نه از فروشنده).

۱۱)آیا ارتفاع اتاق برای تهویه کافی می باشد؟

۱۲)آیا جریان هوا از اتاقک های دیگر، تهویه اتاق یا واحـدهای تهویه مطبوع مستقل با تمامیت سطح کار هود تـداخل پیـدا می کند؟

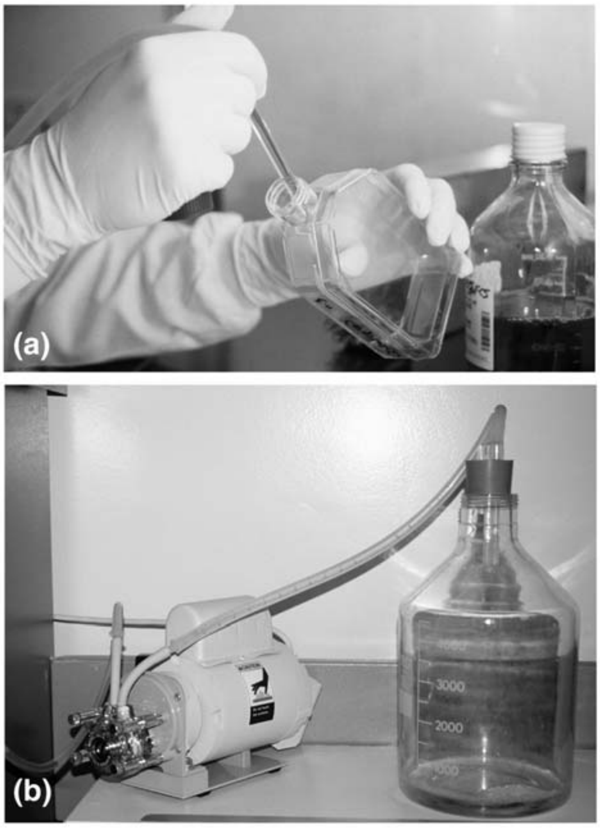
سیلندرهای پی پت (pipette cylinders)

سیلندرهای پی پت باید از پلی پروپیلن ساخته شده باشد و در اطراف آزمایشگاه یکی برای هر ایستگاه کـار و تعـداد کـافی به عنوان ذخیره توزیع شده باشـد تـا امکـان قـرار گـرفتن کـل سیلندر به مدت ۲ ساعت در محلول ضد عفونی کننـده قبـل از شستشو وجود داشته باشد.

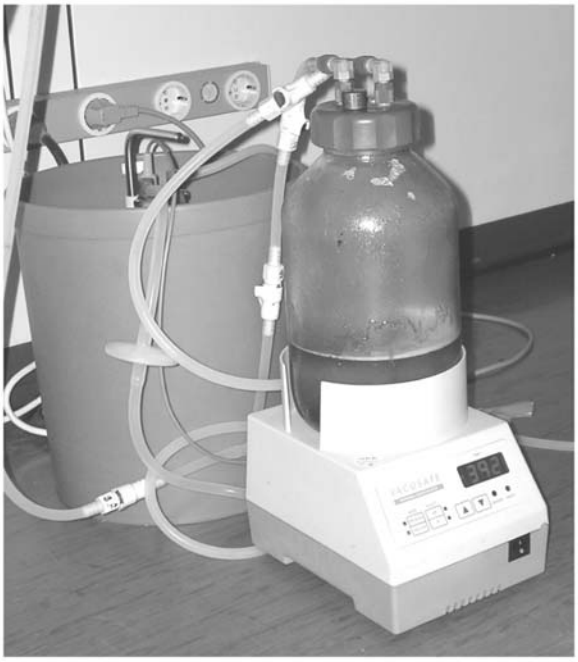
پمپ تخلیه (aspiration pump)

مکش حاصل از یک پمپ پریستالتیک ممکـن اسـت بـرای خارج کردن محیط کشت مصرف شده یا معرف هـای دیگـر از فلاسک کشت استفاده شود. مایع خروجی را می توان مـستقیماً به داخل محلول ضد عفونی کننده در یک ظرف هدایت کرد تـا در صورت استفاده از توپی پنبه ای یـا فیلتـر میکروپـور، خطـر پخش آئروسل ها در جو به حـداقل برسـد. خـط ورودی بایـد نسبت به خط خروجی حداقل ۵cm پایین تر از چوب پنبه قرار گیرد به صورتی که مواد زائد به داخل بر نگردد. لوله های پمپ باید از لحاظ پوسیدگی بررسی شود و پمـپ بایـد توسـط یـک پدال که توسط پا هدایت می شود اداره گردد.

یک پمپ خلاء مشابه با آنچه که در فیلتراسیون استریل وجود دارد ممکن است به جای یک پمپ پریستالتیک استفاده شود.



شکل ۲-۳: خارج کردن محیط کشت توسط مکش. (a) پی پت از طریق لوله به یک پمپ پریستالتیک متصل شده تا برای خارج کردن محیط کشت از فلاسک استفاده شود. (b) خط مکش پمپ پریستالتیک به یک مخزن مواد زائد هدایت می شود.



شکل ۳-۳: پمپ خلاء Integra. پمپ مکش و مخزن برای خارج کردن مایعات از فلاسک ها.

در صورت نیاز از یک پمپ مشابه می توان برای هر دو منظور استفاده کرد: هر چند برای جلوگیری از برگشت مواد زائد به پمپ باید از یک تله استفاده کرد. مایع خروجی را باید در یک مخزن جمع آوری کرد و وقتی کار تمام شد، یک ضدعفونی کننده از قبیل هیپوکلریت به آن اضافه کرد و قبل از تخلیه مخزن حداقل به مدت ۲ ساعت صبر کرد. یک فیلتر میکروپور آبگریز (مثل Pall Gelman) و یک تله ثانویه باید در مسیر خط پمپ قرار داده شود تا از انتقال مایع یا آئروسل جلوگیری شود.

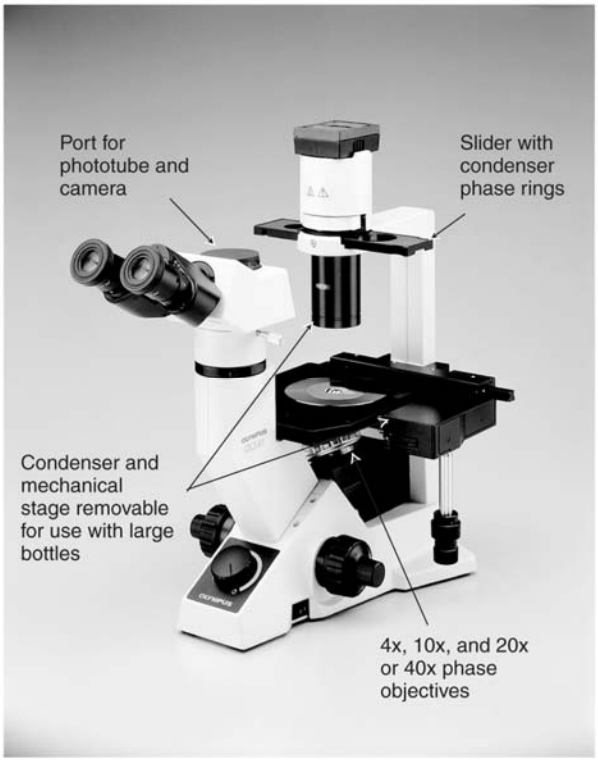
گاریهای سرویس(service carts)

قرار دادن وسایل برای استفاده در هودهای لامینارفلو بر روی گاریهای متحرک مفید می باشد. این گاریها فضای بین هودهای مجاور را پر کرده و برای نگهداری و تعمیر هودها به آسانی برداشته می شوند. همچنین از آنها می توان برای انتقال مواد به هودها و خارج از هودها استفاده کرد. گاریهای بزرگتر برای نقل و انتقال ظروف شیشه ای کثیف و وسایل استفاده شده از ناحیه آسپتیک به محل شستشو مفید می باشند و آنها را می توان در یک محل مناسب پارک کرد.

میکروسکوپ معکوس(inverted microscope)

باید تأکید کرد که علیرغم پیشرفت های قابل توجه در تجزیه و تحلیلهای کمی سلولهای کشت یافته و کاوشگرهای ملکولی، هنوز مشاهده مرتب سلولها ضروری می باشد. اغلب یک تغییر مورفولوژیکی، اولین علامت رو به زوال رفتن یک کشت سلولی می باشد و همچنین می توان توسط مشاهده میکروسکوپی به راحتی آلودگی میکروبی را تشخیص داد.

در آزمایشگاه کشت سلولی وجود یک میکروسکوپ ساده معکوس ضروری می باشد. مطمئن شوید که صفحه میکروسکوپ برای استفاده بطریهای غلتان بزرگ بین کندانسور و صفحه به اندازه کافی بزرگ می باشد. بسیاری از انواع میکروسکوپ های معکوس ساده و ارزان قیمت در بازار موجود می باشد اما اگر شما نیاز به عکسبرداری از کشت های زنده دارید، باید یک میکروسکوپ دارای عدسیهای با کیفیت بالا و یک کندانسور فاز کنتراست با فاصله کار طولانی (long- working- distance) و عدسیهای شیئی با تدارکات لازم برای دوربین عکاسیCCD و مانیتور را سفارش دهید. استفاده فزاینده از پروتئین فلورسنت سبز (green fluorescent protein) برای علامت دار کردن (tagging) سلولهای زنده به این مفهوم می باشد که ممکن است به عدسیهای فلورسنس نیاز باشد. حلقه علامت گذاری نیکون (nikon marking ring) یک وسیله کمکی مفید برای میکروسکوپ معکوس می باشد. این وسیله جایگزین یک عدسی شیئی شده و



شکل ۴-۳: میکروسکوپ معکوس. میکروسکوپ معکوس المپیوس CKX41 مجهز به عدسی های فاز کنتراست و سر سه چشمی دارای درگاه برای اتصال دوربین دیجیتال.

می تواند برای علامت گذاری سطح زیرین یک دیش، جایی که یک کلنی یا تکه سلولی جالب قرار دارد، استفاده شود.

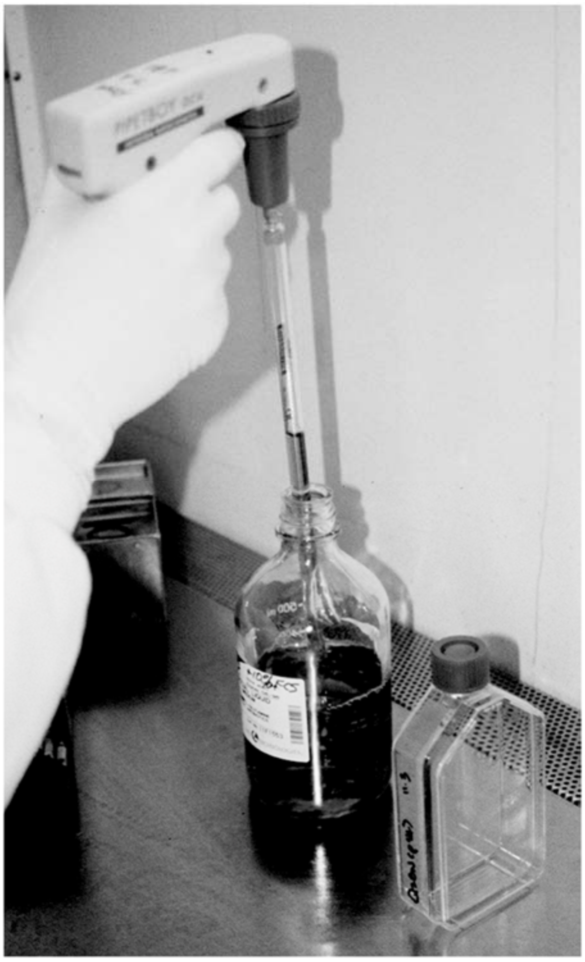
سانتریفوژ

سوسپانسیون های سلولی مرتباً برای افزایش غلظت سلولها یا برای زدودن یک معرف به سانتریفوژکردن نیاز دارند. یک سانتریفوژ کوچک رومیزی، ترجیحاً با یک ترمز کنترل کننده برای اغلب مقاصد کافی می باشد. سلولها در ۸۰-۱۰۰g به طور رضایت بخش ته نشین می شوند؛ نیروی گرانش بیشتر ممکن است باعث صدمه به سلولها شده و آگلوتیناسیون رسوب را افزایش می دهد. در صورت کار با کشت های سوسپانسیون در مقیاس بالا، یک سانتریفوژ یخچال دار با ظرفیت بالا مثلاً ۴×۱L یا ۶×۱L مورد نیاز خواهد بود.

جابه جایی مایعات به صورت استریل- پی پتینگ و توزیع کردن

برداشتن مایعات: مایعات را می توان به آسانی با پی پت برداشت اما در صورت استفاده از یک پی پت دهان گشاد متصل به یک پمپ خلاء یا خط خلاء دارای مخزن مناسب برای جمع آوری مایع خروجی و ممانعت از آلودگی پمپ، یا با استفاده از یک پمپ پریستالتیک ساده که به یک مخزن دارای ماده ضد عفونی کننده تخلیه می شود، فرآیند ساده تر و سریع تر خواهد بود.

پی پت یار(pipetting aid): پی پتینگ ساده یکی از کارهای شدیداً مورد نیاز در دستکاری روتین کشت ها می باشد هر چند استفاده از یک پوار لاستیکی یا وسیله مخصوص پی پتینگ دیگر ارزان و ساده می باشد، با استفاده از یک پی پت یار اتوماتیک که دارای پمپ مجزا و یا همراه می باشد، سرعت و دقت به میزان زیادی افزایش می یابد. مهمترین عامل تعیین کننده در انتخاب یک پی پت یار، وزن و حالت وسیله در طی استفاده متوالی می باشد و بهتر است قبل از خرید آزمایش شود. معمولاً پی پت یار ها دارای یک فیلتر بوده تا انتقال آلودگی را به حداقل برساند. برخی فیلتر ها یک بار مصرف بوده و برخی دیگر بعد از استریل کردن قابل استفاده مجدد می باشند.



شکل۵-۳: پی پت یار- وسیله پی پت کردن موتوری برای استفاده با پی پت های مدرج متداول.

شکل ۶-۳: سمپلر- وسیله پی پت کردن با حجم متغیر. همچنین به صورت حجم ثابت هم موجود می باشد. سمپلر استریل نمی باشد اما از سر سمپلرهای پلاستیکی استریل استفاده می شود.

سمپلرها(pipettors): این وسایل از میکروپی پت های اپندورف منشا گرفته و برای توزیع مقادیر ۱۰-۲۰۰µl استفاده می شوند. به دلیل این که امروزه محدوده کار تا ۵ml توسعه یافته است، واژه میکروپی پت همیشه مناسب نمی باشد و اغلب به آن سمپلر گفته می شود. فقط سر سمپلر به استریل کردن نیاز دارد اما طول سر سمپلر ها اندازه ظروف مورد استفاده را محدود می سازد. در صورتی که با یک سمپلر یک مایع استریل را از یک ظرف بر می دارید، بدنه غیر استریل نباید با دیواره های ظرف تماس پیدا کند.

توزیع کردن مایعات با حجم بالا: وقتی که حجم محیط کشت در ظروف از ۱۰۰ml تجاوز می کند، برای انتقال مایعات باید از یک روش متفاوت استفاده شود. اگر فقط چند فلاسک استفاده می شود ممکن است یک پی پت ۱۰۰ml یا یک بطری مدرج، کاملاً کافی باشد، اما اگر حجم های بسیار زیاد (حدود ۵۰۰ml) یا تعداد زیادی از حجم های تکراری مورد نیاز باشد، احتمالاً به یک پمپ پریستالیک احتیاج می باشد. انتقال مایعات به صورت منفرد در حجم های زیاد(۱۰۰۰۰-۱۰ لیتر) معمولاً با تهیه کشت در یک ظرف تحت فشار و سپس جابه جا کردن آن در داخل ظرف کشت با فشار مثبت انجام می شود. امکان توزیع حجم های زیاد با عمل سرریز کردن وجود دارد اما باید این کار محدود به یک عمل منفرد با یک حجم از پیش اندازه گیری شده باشد.

توزیع کردن تکراری: توزیع کننده تکراری سنتی، سرنگ Cornwall بود که در آن مایع به طور متناوب از طریق یک لوله به داخل یک سرنگ کشیده شده و از طریق یک لوله دیگر با استفاده از یک والو ساده دو راهی به بیرون ریخته می شود. پیستون سرنگ دارای حالت فنری بوده بنابراین کل فرایند به صورت نیمه خودکار و تکراری می باشد. انواع مختلفی از این نوع توزیع کننده وجود دارد که بسیاری از آنها هنوز به صورت مرتب استفاده می شوند.

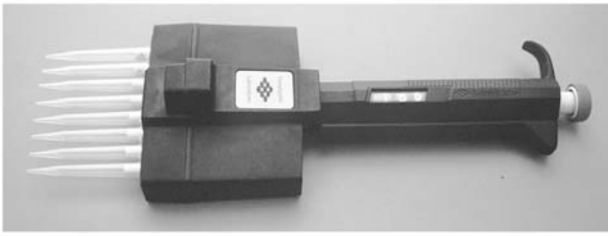
همچنین می توان برای انتقال تکراری پشت سر هم از یک پمپ پریستالتیک استفاده کرد. این روش دارای این مزیت می باشد که پمپ را می توان با یک کلید توسط پا فعال کرد و باعث آزاد بودن دست ها می شود. باید مراقب بود تا از آلودگی لوله در مخزن جلوگیری شود. به طور کلی این روش فقط زمانی با ارزش می باشد که با تعداد زیادی فلاسک کار شود. پی پتینگ خودکار توسط یک پمپ پریستالیک را می توان در سطوح بالا در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ml حفظ کرد. تعدادی لوله مخصوص انتقال را می توان استریل کرد و به صورت استوک نگهداری کرد تا در صورت آلودگی تصادفی یا تغییر در نوع سلول یا معرف، سریع آن را عوض کرد.

اتوماسیون(automation): تلاش های زیادی برای اتوماتیک کردن تعویض مایعات در کشت بافت انجام شده است اما وسایل یا سیستم های اندکی انعطاف پذیری مورد نیاز برای استفاده عمومی را دارند. وقتی که یک سیستم تولیدی استاندارد در حال استفاده می باشد، ممکن است غذا دهی خودکار مفید باشد اما زمان لازم برای راه اندازی آن، تغییراتی که ممکن است در صورت تغییرات سیستم نیاز باشد و اهمیت برتر استریلیتی کامل، بسیاری از آزمایشگاهها را از سرمایه گذاری در زمان و سرمایه های لازم بر حذر داشته است.

با معرفی پلیت های میکروتیتراسیون، بسیاری از توزیع کننده های خودکار، پلیت ریدرها و لوازم دیگر هم به بازار آمد. وسایل انتقال با استفاده از سینی های منفذدار یا پی پت های چند کاناله، بذر افشانی از یک پلیت به پلیت دیگر را آسان تر کرد و همچنین همزن های پلیت و کریرهای سانتریفوژ در دسترس می باشند.

دستگاه سلول شمار (cell counter)

وقتی که با بیش از دو یا سه رده سلولی کار می شود و کنتیک رشد کمی دقیق ضروری می باشد، دستگاه سلول شمار دارای مزیت فراوانی می باشد. چندین شرکت مدل های متفاوتی دارای توانایی شمارش ذرات ساده تا شمارش سلولی



شکل ۷-۳: سمپلر چند کاناله. سمپلر ۸ کاناله که ۸ سر سمپلر پلاستیکی به آن متصل می شود. همچنین سمپلر ۴ و ۱۲ کاناله هم موجود می باشد.

شکل ۸-۳: پلیت ریدر. دانسیته سنج برای اندازه گیری جذب هر چاهک؛ همچنین بعضی از مدل ها فلورسانس را هم اندازه گیری می کند.

خودکار و آنالیز اندازه تولید می کنند. Beckman Coulter و Scharfe ماشین های مناسب برای شمارش روتین را به بازار عرضه می کنند. توزیع کننده های خودکار برای انتقال مایع شمارش غیراستریل مفید می باشند اما وقتی برای شمارش سلولی از توزیع کننده هایی که در بالا دارای بطری می باشند (bottletop) باید قبل از شمارش اجازه دهید به مدت چند دقیقه مایع ته نشین شود، زیرا اغلب با توزیع سریع، حباب های ریزی تولید می شود و این حباب ها توسط دستگاه شمارش خواهند شد.

دوربین CCD و مانیتور

با ظهور مدارهای میکروالکتریکی ارزان، دوربین های تلویزیونی و مانیتورها به یک وسیله کمکی با ارزشی در تشریح مطالب کشت و آموزش کارکنان جدید یا دانشجویان تبدیل شد. انتخاب یک دوربین با درجه وضوح بالا اما نه حساسیت بالا، همانند حساسیت دوربین استاندارد معمولاً کفایت می کند و حساسیت بالا ممکن است منجر به روشنایی بیش از حد شود. معمولاً حالت سیاه و سفید وضوح بهتری داده و برای مشاهدات فازکنتراست کشت های زنده کاملاً کافی می باشد. رنگ برای نمونه های تثبیت شده و رنگ آمیزی شده ترجیح داده می شود. در صورت که شما قصد گفتگو با یک دستیار یا یک یا دو همکار در مورد کشت ها را دارید یک مانیتور ۳۰۰ یا ۴۰۰mm (۱۲ یا ۱۵ اینچ) کافی است اما اگر شما یک گروه ۱۰ تایی یا بیشتر از دانشجویان را آموزش می دهید به یک مانیتور ۵۰۰ یا ۵۵۰mm (۱۹ یا ۲۱ اینچ) احتیاج می باشد. دوربین های ویدیویی CCD با وضوح بالا را می توان برای ضبط و ذخیره تصاویر برای تجزیه و تحلیل های بعدی استفاده کرد. افزودن یک دستگاه ضبط ویدیویی امکان ضبط همزمان را فراهم می سازد.

میکروسکوپ تشریح

تشریح قطعات کوچک بافت (مثل اندام های جنینی یا بافت بی مهرگان کوچکتر) به یک میکروسکوپ تشریح نیاز دارد. همچنین یک میکروسکوپ برای شمارش کلنی های تک لایه مفید بوده و برای شمارش و برگزیدن کلنی های کوچک در آگار ضروری می باشد.

انکوباسیون

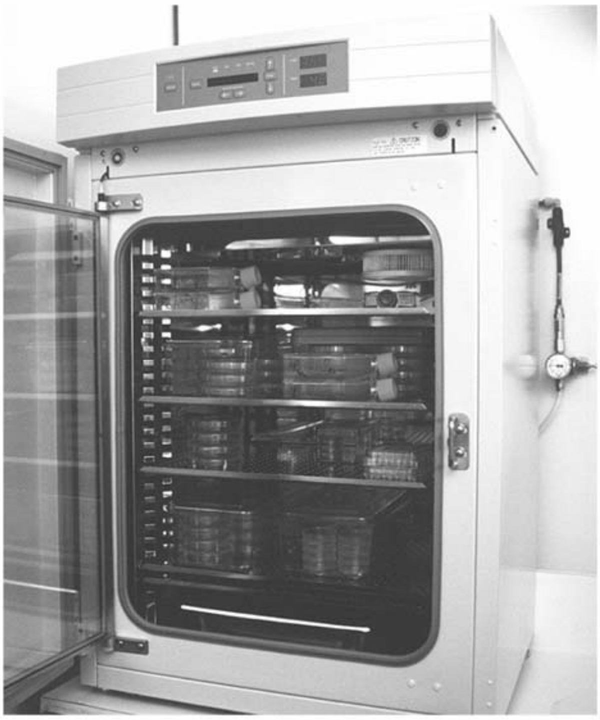
انکوباتور

در صورتی که گرمخانه در دسترس نباشد، ممکن است لازم باشد تا یک انکوباتور خشک معادل آن خریداری شود. حتی در صورت وجود گرمخانه، گاهی اوقات داشتن انکوباتور دیگری نزدیک هود برای تریپسینه کردن مناسب می باشد. انکوباتور باید به اندازه کافی بزرگ باشد، تقریباً L ۲۰۰-۵۰ ، و باید دارای جریان هوای اجباری، کنترل درجه حرارت تا $\pm$ ۰/۲ °C و یک ترموستات ایمنی که از گرم شدن زیاد انکوباتور جلوگیری کرده یا در صورتی که ترموستات اول عمل نکرد درجه حرارت انکوباتور را تنظیم کند. انکوباتور باید در برابر خوردگی مقاوم باشد(مثلاً فولاد ضد زنگ، هرچند که آلومینیوم آنودیزه برای انکوباتورهای خشک قابل قبول می باشد) و به آسانی تمیز شود. یک محفظه دوتایی که یکی در بالای دیگری قرار دارد و به صورت مستقل تنظیم می شوند برای یک انکوباتور بزرگ ترجیح داده می شود چون کشت های بیشتری را با کنترل درجه حرارت بهتری در خود جای می دهد و اگر یک نیمه دچار نقص شد یا احتیاج به تمیز کردن داشت، از نیمه دیگر می توان هنوز استفاده کرد.

بسیاری از انکوباتورها یک مخزن آب برای توزیع یکنواخت درجه حرارت در اطراف اتاقک دارند بنابراین از ایجاد نواحی سرد جلوگیری می شود. همچنین این انکوباتورها در صورت نقص در سیستم گرمکن یا قطع جریان برق درجه حرارت خود را مدت طولانی تری نگه می دارند.

انکوباتور CO_2 مرطوب

هرچند می توان کشت ها را در فلاسک های در بسته در یک انکوباتور خشک معمولی یا در یک گرمخانه نگهداری کرد،



شکل ۹-۳: انکوباتورCO_2 . انکوباتورCO_2 با در باز که فلاسک ها، پلیت های چاهک دار و پتری دیش ها در آن دیده می شوند.

بعضی از ظروف مثل پتری دیش ها یا پلیت های چاهک دار به یک محیط کنترل شده با رطوبت بالا و فشار CO_2 زیاد نیاز دارند. ارزانترین راه برای کنترل فاز گازی، قرار دادن کشت ها در یک جعبه پلاستیکی یا یک محفظه و گازدهی آن با مخلوط CO_2 مناسب و سپس مهر و موم کردن آن می باشد. اگر محفظه به طور کامل با دیش ها پر نشد، یک دیش درباز محتوی آب را برای افزایش رطوبت، درون محفظه قرار دهید.

دستگاه ثبت درجه حرارت

یک دماسنج ثبت کننده در محدوده زیر ۵۰- °C تا حدود ۲۰۰+ °C شما را قادر می کند تا مخازن منجمد شده، منجمد کردن سلول ها، انکوباتورها و آون های استریل کننده را بررسی کنید. آون ها، انکوباتورها و گرمخانه ها باید به طور منظم از لحاظ یکنواختی و ثبات کنترل درجه حرارت بررسی شوند. دماسنج های ثبت کننده باید به طور ثابت در داخل گرمخانه، آون استریل کننده و اتوکلاو کار گذاشته شوند و باید اسناد مربوطه نگهداری شوند تا به طور مرتب وضعیت غیر طبیعی بخصوص در مواقع ایجاد مشکل بررسی شود.

رک های غلتان (roller racks)

رک های غلتان برای افزایش مقیاس کشت های تک لایه استفاده می شوند. انتخاب دستگاه توسط مقیاس(یعنی اندازه و تعداد بطریهایی که باید غلتانده شوند) مشخص می شود. مقیاس ممکن است از تعداد سلول های مورد نیاز، حداکثر دانسیته سلولی قابل دسترس و منطقه سطحی بطریها محاسبه شود. تعداد زیاد بطریهای کوچک بیشترین منطقه سطحی را فراهم می سازد اما باعث می شود تا دستکاری آنها پر زحمت باشد، بنابراین بطریهای دارای حدود ۱۲۵ mm قطر و طول های مختلف از ۱۵۰ تا ۵۰۰ mm مناسب می باشند.

طول بطری تعیین کننده حداکثر بازده می باشد اما با اندازه رک محدود می شود. ارتفاع رک مشخص کننده تعدادی ردیف های بطری می باشد. هرچند خرید یک رک بزرگتر ارزانتر از خرید چند رک کوچک می باشد، اما رک های کوچکتر:

۱) شما را قادر می سازد که به صورت تدریجی توان رک ها را افزایش دهید.
۲) قرار دادن آنها در گرمخانه راحت تر است.
۳) در صورتی که یک رک نیازمند تعمیر بود باز هم شما قادر به استفاده از رک های دیگر می باشید.

ذخیره سازی

یخچال و فریزر

معمولاً یک یخچال یا فریزر خانگی کاملاً کارآمد بوده و ارزانتر از انواع آزمایشگاهی اختصاصی می باشد. همچنین یخچالهای خانگی فاقد فریزر در دسترس می باشند. این یخچالها فضای بیشتری را فراهم کرده و نیازی به برفک زدایی آنها نمی باشد. هر چند اگر شما به یک منبع ذخیره ۴۰۰ لیتری یا بزرگتر نیاز داشته باشید، ممکن است یک یخچال بزرگ آزمایشگاهی مناسب تر باشد.

بیشتر معرف های کشت سلولی را می توان به طور رضایت بخش در دمایC °۲۰- نگهداری کرد. بنابراین برای نگهداری آنها به فریزرهای با دمای بسیار پایین(مثلاً C °۷۰-) نیازی نمی باشد، اما در طی منجمد نگهداری سلولها، قبل از اینکه آنها را وارد تانک ازت مایع کنیم باید آنها را در فریزر C °۷۰- قرار دهیم.

محفظه های مخصوص ذخیره سازی در سرما

انتخاب محفظه های مخصوص ذخیره سازی در سرما به اندازه و نوع سیستم ذخیره سازی مورد نیاز وابسته می باشد. برای یک آزمایشگاه کوچک، یک فریزر ۳۵ لیتری با یک دهانه باریک و ذخیره سازی در کن ها و کانیسترها یا در کشوها، در یک سیستم رک باید حدود ۱۰۰۰-۵۰۰ آمپول را در خود جای

دهد. فریزرهای بزرگتر بیش از ۱۰۰۰۰ آمپول را در خود جای خواهند داد.

همچنین باید یک مخزن ذخیره سازی مناسب برای ذخیره سازی نیتروژن مایع تهیه شود. اندازه مخزن وابسته به ۱) اندازه فریزر ۲) تعداد دفعات و قابلیت اطمینان انتقال نیتروژن مایع و ۳) میزان تبخیر نیتروژن مایع می باشد.

یک فریزر دهانه باریک ۳۵ لیتری که ۱۰-۵ لیتر در هفته مصرف می کند فقط به یک محفظه دوجداره ۲۵ لیتری نیاز خواهد داشت. فریزرهای بزرگتر بهتر است که به صورت on-line از یک تانک ذخیره سازی اختصاصی، نیتروژن خود را تأمین کنند(مثلاً یک مخزن ذخیره سازی ۱۶۰ لیتری متصل به یک فریزر ۳۲۰ لیتری دارای پرکننده خودکار و هشدار دهنده یا یک تانک ۵۰۰ لیتری برای یک فریزر بزرگتر یا برای چندین فریزر کوچکتر).

فریزرهای قابل کنترل

هرچند که سلول ها را می توان به آسانی با قرار دادن آنها در یک جعبه عایق بندی شده در دمای $-70\ ^{\circ}C$ منجمد کرد، بعضی از سلول ها ممکن است به مقادیر سردکنندگی متفاوت یا پیچیده نیاز داشته باشند. یک فریزر قابل برنامه ریزی با کنترل میزان تزریق نیتروژن مایع در داخل محفظه، تحت کنترل یک برنامه از پیش تعیین شده انجماد، میزان سردکنندگی متفاوتی را فراهم می سازد.

فریزرهای با درجه حرارت پایین

اغلب معرف های کشت بافت را می توان در دمای $4\ ^{\circ}C$ یا $-20\ ^{\circ}C$ ذخیره سازی کرد، اما گاهی اوقات بعضی از داروها، معرف ها یا محصولات کشت را لازم است تا در درجه حرارت $-70\ ^{\circ}C$ تا $-90\ ^{\circ}C$ نگهداری کرد. همچنین یک فریزر $-70\ ^{\circ}C$ تا $-90\ ^{\circ}C$ برای منجمد کردن سلول ها در داخل یک ظرف عایق بندی شده مفید می باشد. فریزرهای صندوقی در ایجاد یک درجه حرارت پایین با حداقل مصرف برق کارآمدتر می باشند اما فریزرهای ایستاده به فضای کمتری نیاز داشته و دسترسی به آنها آسانتر می باشد. در صورتی که یک فریزر ایستاده را انتخاب کردید مطمئن شوید که دارای قسمت های مجزا مثلاً شش تا هشت قسمت در یک فریزر ۴۰۰ لیتری و هر قسمت دارای در مجزا می باشد.

فریزرهای با درجه حرارت پایین مقدار زیادی گرما تولید می کنند که برای عملکرد صحیح، این گرما باید پخش شود. چنین فریزرهایی باید در یک اتاق دارای تهویه مناسب یا دارای سیستم تهویه مطبوع قرار گیرد تا درجه حرارت محیط از $23\ ^{\circ}C$ بالاتر نرود. در صورتی که این امر امکان پذیر نباشد از یک فریزر مخصوص نواحی گرمسیری استفاده کنید.

فصل چهارم

تکنیک آسپتیک

اهداف تکنیک آسپتیک

آلودگی با میکروارگانیسم، یک مشکل عمده در کشت بافت می‌باشد. باکتریها، میکوپلاسما، مخمر و اسپورهای قارچی ممکن است از طریق کاربر، اتمسفر، سطح کار، محلولها و بسیاری از منابع دیگر وارد شوند. تکنیک آسپتیک صحیح چنین آلودگیهایی را برطرف می‌سازد. در این خصوص ایجاد یک مجموعه مقررات سخت کاری و پایبند بودن به آن بخصوص اگر چندین نفر از یک فضای کار مشابه استفاده می کنند ضروری می‌باشد.

آلودگی ممکن است کم و محدود به یک یا دو کشت باشد، ممکن است در بین چندین کشت گسترش یافته و کل نمونه‌ها را آلوده سازد و یا می‌تواند گسترده بوده و کل استوک شما یا حتی تمام آزمایشگاهها را آلوده سازد. آلودگی می‌تواند به حداقل برسد اگر:

۱) هر زمانی که کشت‌ها دستکاری می‌شوند با دقت با چشم و با میکروسکوپ ترجیحاً نوع فاز کنتراست بررسی شوند.

۲) کشت‌ها حداقل مدتی بدون آنتی بیوتیک نگهداری شوند تا آلودگیهای مخفی آشکار شوند.

۳) معرف‌ها قبل از استفاده از لحاظ استریل بودن چک شوند (توسط خود شما یا شرکت سازنده).

۴) بطریهای محیط کشت و غیره با افراد دیگر مشترک نباشد یا برای رده‌های سلولی مختلف استفاده نشود و

۵) استاندارد تکنیک استریل در تمام مواقع بالا نگه داشته شود.

آلودگی میکوپلاسمایی، توسط میکروسکوپهای معمولی قابل مشاهده نبوده و یکی از تهدیدهای اصلی کشت سلولی می‌باشد. در صورتیکه این نوع آلودگی تشخیص داده نشود، می‌تواند به کشت‌های دیگر در آزمایشگاه گسترش یابد. بنابراین در صورتیکه رشد سلولی غیر طبیعی به نظر می‌رسد لازم است که یک آزمایش میکوپلاسمایی صورت پذیرد.

حفظ استریلیتی

تکنیک آسپتیک صحیح باید سدی را بین میکروارگانیسم‌های محیط بیرون از کشت و کشت خالص و غیرآلوده در داخل فلاسک یا دیش ایجاد کند. بنابراین تمام موادی که در تماس مستقیم با کشت خواهند بود، باید استریل شوند و دستکاری باید به گونه‌ای صورت پذیرد که هیچ گونه تماس مستقیمی بین کشت و محیط غیراستریل اطراف آن وجود نداشته باشد. مشخص شده است که سد استریلیتی بدون کار تحت شرایطی که اغلب دستکاریهای روتین را باز می دارد نمی‌تواند به صورت مطلق باشد.

ارکان محیط آسپتیک

محیط آرام

در غیاب هود لامینارفلو، برای کار استریل باید از یک اتاق مجزا و استریل استفاده شود. در صورتیکه این کار امکان پذیر نباشد، یک گوشه آرام از آزمایشگاه که رفت و آمد کمی داشته و یا فاقد رفت و آمد است را انتخاب کنید. در صورت وجود لامینارفلو، ناحیه‌ای باید انتخاب شود که از جریان هوای درها، پنجره‌ها و غیره دور باشد، همچنین این ناحیه باید هیچگونه ترافیک و تجهیزاتی که تولید جریان هوا می‌کنند (مثل سانتریفوژ، یخچال و فریزر) نداشته باشد و دستگاههای تهویه مطبوع باید در جایی تعبیه شوند که با عملکرد هود تداخل پیدا نکنند. باید فعالیت محدود به کشت بافت بوده و کشت‌های میکروبی و حیوانات، خارج از ناحیه کشت بافت باشند. این ناحیه باید تمیز و عاری از گرد و غبار نگهداری شده و نباید به

جز وسایل مورد نیاز برای کشت بافت، وسایل دیگر در آنجا قرار گیرد. فعالیت‌های غیر استریل، از قبیل فرآوری نمونه، رنگ آمیزی یا استخراج‌ها باید جای دیگری انجام گردد.

سطح کار

لازم است که سطح کار تمیز و مرتب نگهداشته شود. مقررات زیر باید رعایت شود:

۱) با یک سطح کاملاً تمیز شروع کنید.
۲) سطح را با الکل ۷۰٪ کاملاً سواب کنید.
۳) فقط وسایلی را که نیاز دارید به سطح کار بیاورید.
۴) هر چیزی را که مورد نیاز نمی‌باشد خارج کرده و سطح را در بین کارها سواب کنید.
۵) ناحیه کار را به گونه‌ای مرتب کنید که
a) دسترسی آسان به هر وسیله داشته باشید.
b) یک فضای وسیع و تمیز در مرکز میز کار (و نه فقط در لبه جلویی) برای کارکردن داشته باشید. اگر وسایل زیادی نزدیک شما باشد به ناچار سر پی‌پت استریل به سطح غیراستریل برخورد می‌کند.

بعلاوه در هودی که با وسایل پر ازدحام شده است، جریان هوای لامینار به درستی کار نخواهد کرد.

۶) در یک فضای تمیز بدون هیچگونه مانع بین ناحیه کار مرکزی و فیلتر HEPA کار کنید.
۷) در محدوده دیدتان کار کنید (مثلاً یک پی‌پت را در یک پوار(bulb) یا پی پت یار(pipetting aid) قرار داده یا به صورتی قرار دهید که نوک پی‌پت در جهت خلاف شما باشد به طوریکه پیوسته در میدان دید شما بوده و دستان شما در مقابل آن قرار نگیرد).
۸) هرگونه آلودگی را بلافاصله پاک کرده و ناحیه را با الکل ۷۰٪ سواب کنید.
۹) هر چیزی را که کار شما با آن تمام شد خارج کرده و مجدداً سطح کار را سواب کنید.

بهداشت شخصی

بحث‌های زیادی در مورد اینکه آیا شستن دستها تعداد باکتریهای پوست را کم یا زیاد می‌کند وجود دارد. بدون توجه به این بحث‌ها، شستشو، دستها را مرطوب کرده و پوست خشک که ممکن است وارد کشت شما شود را برطرف می‌سازد. همچنین شستشو، میکروارگانیسم‌هایی که به طور سست چسبیده‌اند و بالاترین خطر را برای کشت‌های شما فراهم می‌سازند را کاهش می‌دهد. از دستکش‌های جراحی می توان استفاده کرد و مرتب آنها را با الکل سواب کرد، اما ممکن است ترجیح داده شود که (جایی که هیچگونه خطری وجود ندارد) بدون دستکش کار شود تا حساسیت زیاد برای کارکردن فراهم شود. کلاه، روپوش و ماسک صورت تحت شرایط GMP (Good Manufacturing Practice) لازم می‌باشد اما تحت شرایط عادی بخصوص هنگامی که با هود لامینارفلو کار می‌شود لازم نمی‌باشد. در صورتیکه موهای شما بلند است آن را در پشت سر ببندید. هنگام کار بر روی یک میز کار روباز در شرایط آسپتیک، صحبت نکنید. وقتی در یک هود لامینارفلو عمودی کار می‌کنید، با یک مانع میان شما و کشت، مجاز به صحبت کردن می‌باشید اما باید در حداقل زمان ممکن باشد. در صورتیکه سرماخوردگی داشته باشید، از یک ماسک صورت استفاده کرده و یا بهتر این است که در طی دوران عفونت هیچگونه کشت بافتی انجام ندهید.

معرف‌ها و محیط‌های کشت

معرف‌ها و محیط‌های کشتی که از شرکت‌های تجاری خریداری شده‌اند، کنترل کیفیت شدیدی را طی کرده تا مطمئن شوند که استریل می‌باشند، اما سطح خارجی بطریها استریل نمی باشد. بعضی از شرکت‌ها بطریهایی را تهیه می‌کنند که در پلی اتیلن پیچیده شده که آنها را تمیز نگه داشته و امکان قراردادن آنها در حمام آب برای گرم یا ذوب شدن وجود خواهد داشت. پوشش باید در خارج هود برداشته شود. بطریهای پوشیده نشده را باید پس از خارج کردن از یخچال یا حمام آب در الکل ۷۰٪ سواب کرد.

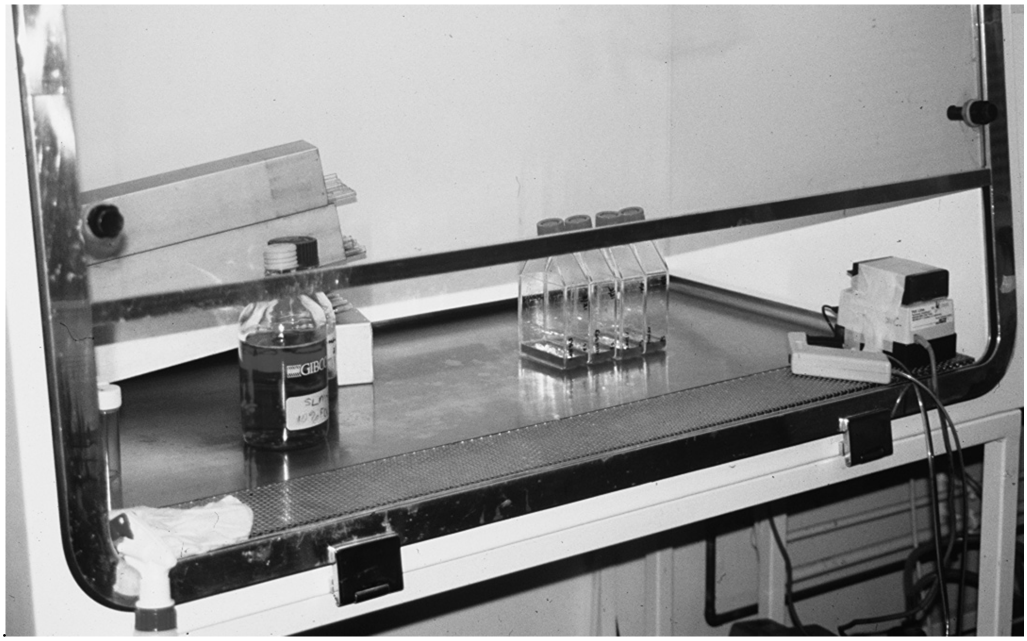
کشت‌ها

کشت‌هایی که از آزمایشگاههای دیگر وارد می‌شوند، دارای ریسک بالایی می‌باشند چون ممکن است در مبداء یا در هنگام حمل آلوده شده باشند. رده‌های سلولی وارد شده همیشه باید قرنطینه شوند؛ یعنی باید آنها را جدا از بقیه استوکها دستکاری کرد و تا زمانیکه مشخص شود فاقد آلودگی هستند، بدون آنتی بیوتیک نگهداری شوند. سپس ممکن است آنها را در استوک اصلی وارد کرد. نباید از آنتی بیوتیکها به صورت روتین استفاده شود چون ممکن است آنها بعضی از آلودگیها را فرو نشانده اما حذف نکنند.

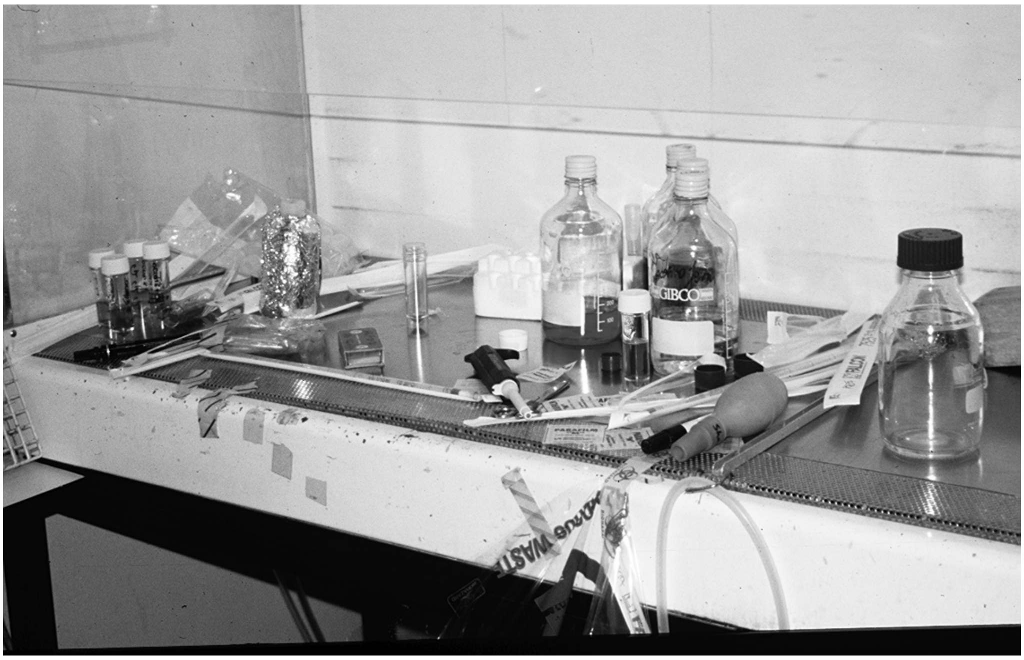
کارکردن استریل

سواب کردن

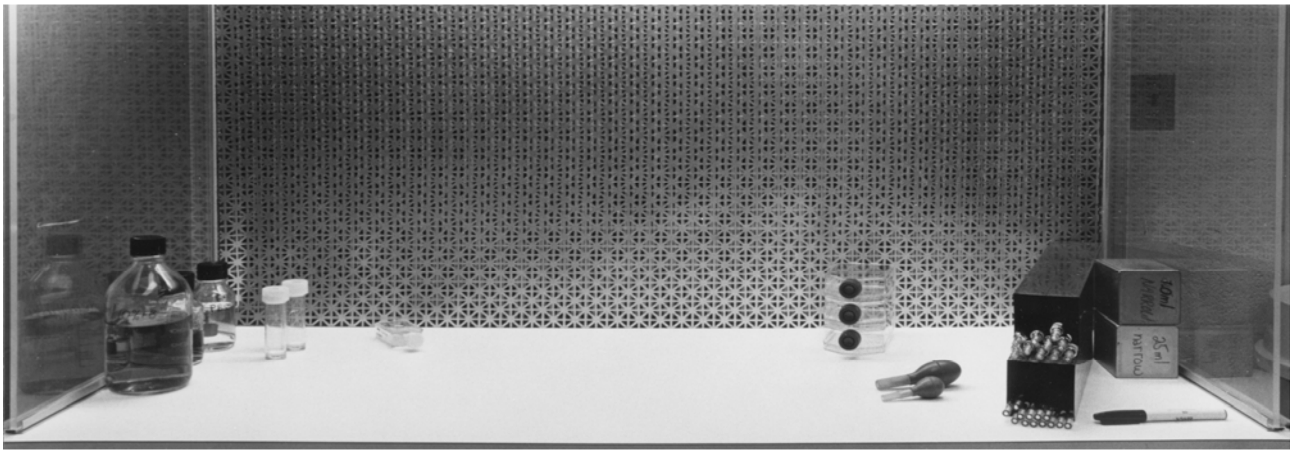
سطح کار را قبل و در حین کار وبخصوص پس از هرگونه آلودگی سواب کرده وهمچنین وقتی که کار شما تمام شد مجدداً آنرا سواب کنید. بطریها را بخصوص آنهایی را که از سردخانه بیرون می‌آورید قبل از استفاده از آنها برای اولین بار، هر دفعه سواب کرده و همچنین هر فلاسک یا جعبه‌ای را که از انکوباتور بیرون می‌آورید سواب کنید. گاهی اوقات سواب



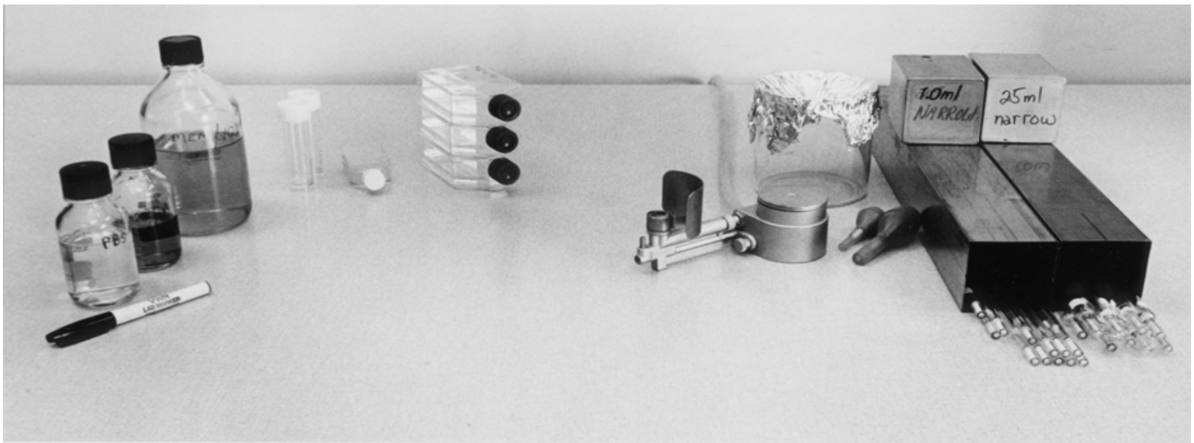
شکل ۱-۴: آرایش پیشنهادی ناحیه کار. هود لامینار فلو دارای آرایش صحیح می باشد. موقعیت وسایل را می توان برای افراد چپ دست معکوس کرد.



شکل ۲-۴: ناحیه کار که به طور نامناسب چیده شده است. هود لامینار فلو به طرز نادرست استفاده می شود. هود خیلی پر شده و وسایل زیادی در جلو مانع ورود هوا شده و جریان هوای لامینار را به هم ریخته و باعث به مخاطره افتادن سطح محدود کنندگی و استریل بودن می شوند.



شکل ۳-۴: آرایش هود لامینار فلو افقی. آرایش یک هود لامینار فلو افقی برای انجام کار صحیح. موقعیت وسایل را می توان برای افراد چپ دست معکوس کرد.



شکل ۴-۴: آرایش ناحیه کار بر روی میز رو باز. وسایل به صورت هلالی شکل در اطراف ناحیه کار در مرکز چیده شده اند. شعله بونزن در مرکز قرار گرفته تا برای شعله دهی نزدیک باشد.

کردن بر چسب‌ها را پاک می‌کند، بنابراین سعی کنید از ماژیک‌های مارکر مقاوم به الکل استفاده کنید

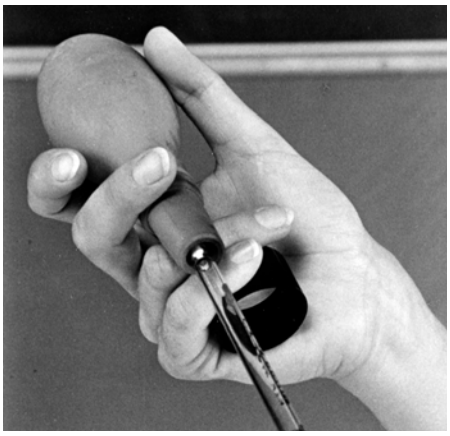
درپوش گذاری (capping)

سرپوش‌های پیچی عمیق برای در پوش‌ها ترجیح داده می‌شود، هر چند باید در شستن در پوش‌ها دقت کرد تا اطمینان حاصل شود که تمام ماده شوینده از بین شیارها خارج شود. در صورت امکان باید از سرپوش‌های پلی‌پروپیلن بدون لایی (wadless) استفاده کرد. سرپوش‌های پیچی باید با فویل آلومینیومی پوشیده شوند تا از نشستن گرد وغبار بر روی دهنه آنها ممانعت شود، هر چند با استفاده از سرپوش‌های پلی‌پروپیلن عمیق (مثلDuran) استفاده از فویل برای پوشاندن آنها کمتر لازم می‌باشد.

شعله دهی

وقتی بر روی یک میز کار رو باز کار می‌کنید، باید دهانه بطریها و سرپوش‌ها را قبل و بعد از باز کردن بطری و قبل و بعد از بستن آن شعله دهی کنید. پی‌پت‌ها باید قبل از استفاده شعله دهی شوند. نزدیک شعله، کار کرده و بطریها را به حالت در باز نگذارید. سرپوش‌های پیچ دار را به صورتیکه طرف باز آنها به سمت پایین قرار گیرد بر روی یک سطح تمیز قرار داده و قبل از گذاشتن روی بطری آنرا شعله دهی کنید. همچنین می‌توان سرپوش‌های پیچی را در طی پی‌پت کردن در دست نگه داشته تا نیاز برای شعله دهی یا گذاشتن آنها روی سطح کار بر طرف شود.

هنگامی که در یک هود لامینارفلو کار می‌کنید، استفاده از شعله توصیه نمی‌شود، زیرا شعله باعث گسیخته شدن جریان لامینار در هود می‌شود و هم استریل بودن هود و هم سطح محدود کنندگی مواد دارای خطر زیستی را به مخاطره می‌اندازد. همچنین یک شعله رو باز می‌تواند باعث خطر آتش‌سوزی،



شکل ۵-۴: نگهداری پوار و درپوش. درپوش را می توان باز کرد و در بین کف دست و انگشت کوچک قرار داد و پوار یا پی پت یار را با انگشتان دیگر نگهداشت.

آسیب به فیلتر HEPA و ذوب لوازم پلاستیکی داخل هود شود.

کار کردن با بطری‌ها و فلاسک ها

وقتی بر روی یک نیمکت رو باز کار می‌کنید، نباید هنگامی که بطریها باز هستند آنها را به حالت عمودی نگه دارید؛ در عوض آنها را تا حد امکان به حالت زاویه دار نگه دارید. برای کج نگه داشتن بطریها یا فلاسک‌ها می‌توان از یک رک مخصوص بطری استفاده کرد. وقتی که فلاسک‌های کشت باز می‌باشند باید به صورت افقی قرار گرفته و همانند بطریها در طی دستکاری باید به صورت کج نگه داشته شوند. وقتی که در هود لامینارفلو کار می‌کنید، بطریها را می‌توان به صورت در باز و عمودی قرار داد اما نگذارید که دستان شما ویا هرگونه اشیاء دیگر بین ظرف در باز یا پی‌پت‌استریل و فیلتر هوای HEPA قرار گیرد.

پی‌پت کردن

هنوز پی‌پت‌های شیشه‌ای استاندارد یا پلاستیکی یکبار مصرف ساده ترین راه برای انتقال مایعات می‌باشند. گاهی اوقات از سرنگ استفاده می‌شود اما سر سرنگهای معمولی برای رسیدن به ته بیشتر بطریها، کوتاه می‌باشند. همچنین ممکن است وقتی که با سرنگ کردن سلولها توزیع می‌شوند، نیروی برشی (shearing force) بیشتری تولید شده و همچنین این طرز کار خطر خود تلقیحی را افزایش می‌دهد. سرنگ‌های دارای کانولای کلفت و سوراخ گشاد نسبت به پی‌پت ترجیح داده می‌شوند اما به سرعت پی‌پت نمی‌باشند مگر اینکه از توزیع کننده‌های چند مرحله‌ای استفاده شود.

باید پی‌پت‌ها در محدوده اندازه مناسب انتخاب شوند. پی‌پت‌ها ۱mL، ۲mL، ۵mL، ۱۰mL و ۲۵mL پاسخگوی اغلب نیازها می‌باشد، هر چند اکنون پی‌پت‌های یکبار مصرف ۱۰۰mLموجود می‌باشد و برای تهیه محیط کشت و توزیع آن در مقایر کمتر مفید می‌باشد. در صورتیکه از پی‌پت‌های شیشه‌ای استفاده می‌کنید و فقط تعداد کمی از هر کدام را لازم دارید، از کن‌های مختلط برای استریلیزاسیون و صرفه جویی در فضا استفاده کنید. پی‌پت‌های پلاستیکی یک بار مصرف باید به صورت دو لایه پوشیده شده باشند و باید قبل از قرار گرفتن در هود، پوشش بیرونی برداشته شود. پی‌پت‌های استفاده نشده را باید در یک ظرف بدون گرد و غبار ذخیره کرد.

باید از پی‌پت کردن با دهان خودداری شود، زیرا مشخص شده است که یک عامل در آلودگی میکوپلاسمایی بوده و ممکن است برای کاربر مخاطره آمیز باشد (مثلاً در مورد رده‌های سلولی، بیوپسی انسان یا نمونه‌های اتوپسی آلوده به ویروس یا مخاطرات بالقوه دیگر). پوار و وسایل الکتریکی پی‌پتینگ ارزان موجود می‌باشد؛ سعی کنید از بین این وسایل آنهایی را که برای شما مناسبتر است انتخاب کنید. وسیله‌ای را که انتخاب می‌کنید باید با تمام اندازه‌های پی‌پت‌های مورد استفاده شما، بدون اینکه برای وارد کردن آنها احتیاج به فشار بوده ویا اینکه پی‌پت از آن رها شود، متناسب باشد. تنظیم جریان باید آسان وسریع باشد اما در عین حال در همان زمان قادر به تنظیم آن هم باشید. شما باید قادر به کشیدن مکرر مایع به بالا و پایین باشید(مثلاً برای پخش کردن سلولها)، و باید هیچگونه ترسی از انتقال وجود نداشته باشد. وسیله باید به آسانی در دست شما فیت شده و باید کار با یک دست آسان باشد.

سمپلرها(گیلسون، آکسفورد، اپندورف و غیره) مخصوصاً برای حجم‌های کم (۱mLو کمتر) مناسب می‌باشند، هرچند امروزه تا حجم ۵mL هم موجود می‌باشند. چون رسیدن به ته ظرف بزرگتر بدون تماس با دیواره‌های ظرف مشکل می‌باشد، سمپلرها فقط باید با ظروف کوچک از قبیل ظروف یونیورسال استفاده شوند. همچنین ممکن است برای حجم‌های بیشتر از سر سمپلرهای دراز تر استفاده کرد. سمپلرها مخصوصاً برای آزمونهای میکروتیتراسیون و دیش‌های چند گانه دیگر مفید می‌باشند، اما نباید برای انتقال پی‌درپی استفاده شوند، مگر اینکه از سر سمپلرهای فیلتردار استفاده شود. سمپلرهای چند کاناله (با۴، ۸ یا ۱۲ کانال) برای دیش‌های میکروتیتراسیون، موجود می‌باشد.

قبل از استریل پی‌پت‌های شیشه‌ای لازم است که در بالای آنها یک توپی پنبه‌ای قرار داد تا پی‌پت‌ها را در طی استفاده استریل نگه دارد. این توپی از آلودگی پوار یا پی پت یار ممانعت کرده و خطر آلودگی متقاطع را کاهش می‌دهد. در صورتیکه توپی خیس شد، پی‌پت را در محلول

ضد عفونی کننده قرار داده تا برای شستشو به ماشین شستشو بر گردانده شود. قراردادن توپی درپی‌پت‌ها برای استفاده استریل و خارج کردن توپی‌ها قبل از شستشو یک کار بسیارخسته کننده می‌باشد. امروزه دستگاهای توپی گذار اتوماتیک موجود می‌باشند و هر چند گران قیمت بوده اما به فرایند سرعت بخشیده و زحمت را کاهش می‌دهند.

در صورت امکان مایعات را از یک ظرف استریل به ظرف دیگر نریزید، مگر اینکه بطری که شما از آن مایع را خارج می‌کنید فقط یک بار استفاده شده باشد و ترجیحاً تمام محتویات در یک بار انتقال یابد(از قبل اندازه گیری شده باشد). خطر عمده در سرریز کردن به دلیل تولید پلی از مایع بین بیرون بطری و داخل آن می‌باشد که ممکن است اجازه ورود آلودگی را به داخل بطری بدهد، به طوریکه بطری‌ها یا فلاسک‌هایی که بعد از ریختن، ذخیره یا انکوبه می‌شوند در معرض خطر بسیار بیشتری می‌باشند.

جریان لامینار

مزیت عمده کار کردن در یک هود لامینار فلو این است که محیط کار توسط یک جریان دائمی و پایدار از هوای فیلتر شده که برروی سطح کار عبور می‌کند، محافظت می‌شود. دو نوع عمده از جریان وجود دارد:۱) افقی، که جریان هوا از سطح روبروی شما، موازی با سطح کار دمیده می‌شود ومجدداً گردش نمی‌کند و ۲) عمودی، که هوا از بالای هود به داخل سطح کار دمیده شده و از بین سطح کار کشیده شده و مجدداً گردش کرده و یا خارج می‌شود. در اغلب هودها، ٪۲۰ از هوا، تهویه شده و با کشیدن هوا در ناحیه جلو سطح کار جبران می‌شود. هودهای دارای جریان افقی پایدارترین جریان هوا و بهترین حفاظت استریل را برای کشت و معرف‌ها فراهم می‌سازند؛ هودهای با جریان عمودی حفاظت بیشتری برای کاربر فراهم می‌سازند؛ در صورتی که با مواد بالقوه خطرناک (کشت‌های منشاء گرفته از نخستیان یا انسان، کشت‌های آلوده شده با ویروس و غیره) کار می‌شود باید از یک هود مخاطره زیستی کلاس II با جریان عمودی استفاده کرد. بهترین محافظت در برابر مخاطرات شیمیایی و رادیو شیمیایی، توسط هود سیتوتوکسیسیتی که برای این کار طراحی شده و دارای یک تله فیلترکربن در جریان هوای در حال گردش می‌باشد و یا یک هودی که همه هوا را به بیرون تهویه می‌کند، فراهم می‌شود. در صورتی که با پاتوژن های انسانی شناخته شده کار می‌شود، استفاده از یک اتاقک پاتوژنی کلاس III که دارای یک تله پاتوژن در سر راه تهویه هوا است، اجباری می‌باشد. کارایی هودهای لامینار فلو وابسته به یک کاهش فشار حداقل درعرض فیلتر می‌باشد.

وقتی که فیلتر مسدود می‌شود، میزان جریان هوا در اتاقک کاهش می‌یابد و شدت جریان هوای لامینار کاهش یافته و دیگر استریل بودن نمی‌تواند حفظ شود. کاهش فشار را می‌توان با یک مانومتر که در اتاقک جاگذاری شده مشخص کرد اما ترجیح داده می‌شود که جریان هوا با یک آنمومتر (anemometer) به طور مستقیم اندازه‌گیری شود.

چک کردن مرتب فیلترهای اولیه ضروری می‌باشد (تقریباً هر سه تا شش ماه). در هودهای با جریان افقی، می‌توان بعد از خاموش کردن پروانه، فیلترها را خارج کرد و آنها را دور انداخت و یا با آب و صابون شستشو داد، چون معمولاً این فیلترها از فوم پلی‌اورتان (polyurethane foam) ساخته شده‌اند. فیلترهای اولیه در هودهای دارای جریان عمودی و هودهای مخاطره زیستی در داخل قرار داشته و باید توسط یک مهندس تعویض شود. این فیلترها را باید سوزاند وخاکستر کرد ویا اتوکلاو کرده و دور انداخت.

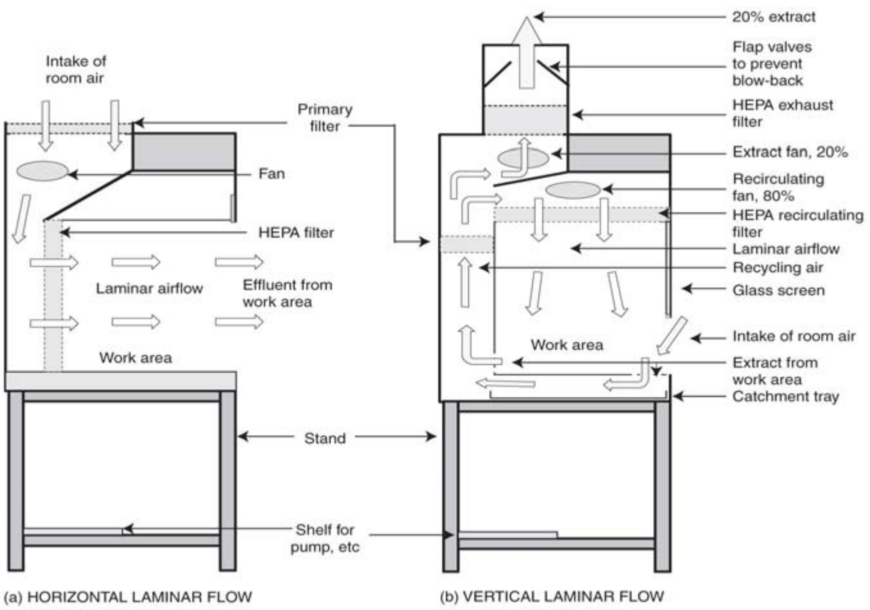
هر ۶ ماه یکبار باید جریان هوا و منافذ فیلتر HEPA اصلی بالای سطح کار بازبینی شود. بهتر است که بررسی توسط مهندسین حرفه‌ای صورت پذیرد. همچنین اتاقک‌های کلاس II دارای فیلترهای HEPA در سر راه جریان خروجی بوده که لازم است هرچند وقت یک بار تعویض شوند.

سطح کار باید به طور مرتب چک شود و هر گونه آلودگی پاک گردد، سینی شسته شده و سطح با ضدعفونی کننده ٪۵ فنولی در الکل ٪۷۰ استریل شود. بهتر است که هودهای لامینار فلو به طور پیوسته کار کنند، زیرا این امر سطح کار را تمیز نگه می‌دارد. در هودهای لامینار فلو از نور UV برای استریل کردن هوا و سطوح کار در بین کارها استفاده می‌شود. کارایی نورUV برای استریل کردن شکافها و منافذ مورد تردید می‌باشد زیرا نمی‌تواند به آنها برسد در حالیکه این منافذ با الکل یا عوامل استریل کننده دیگر به طور مؤثرتر استریل می‌شوند زیرا به علت خاصیت موئینگی به راحتی به درون آنها نفوذ می‌کنند. نور UV برای بدن به خصوص چشم‌ها مضر بوده و همچنین اگر به همراه الکل استفاده شود پس از شش ماه تا یک سال باعث ترک خوردن بعضی از صفحات پلاستیکی شفاف(مثل Perspex) می‌شود.

نکته ایمنی) در صورت استفاده از UV باید از عینک محافظ استفاده شود و تمام پوست در معرض UV، پوشانده شود.

انکوباتورها

انکوباتورهای مرطوب یک منبع عمده آلودگی می‌باشند. آنها را باید در فواصل زمانی منظم (هفتگی یا ماهیانه، برحسب سطح آلودگی و دفعات استفاده) با خارج کردن تمام محتویات شامل همه رک‌ها یا سینی‌ها و شستشوی داخل انکوباتور و رک‌ها یا قفسه‌ها با یک دترژنت غیر سمی مثل decon یا rocall تمیز کرد. مقادیر باقیمانده دترژنت را باید با الکل٪۷۰ برطرف کرد و باید قبل از جایگزین کردن قفسه‌ها و کشت‌ها در انکوباتور اجازه داده شود که به طور کامل تبخیر شود.



شکل ۶-۴: جریان هوا در هودهای لامینار فلو. پیکان ها جهت جریان هوا را نشان می دهند. (a) جریان افقی. (b) جریان عمودی.

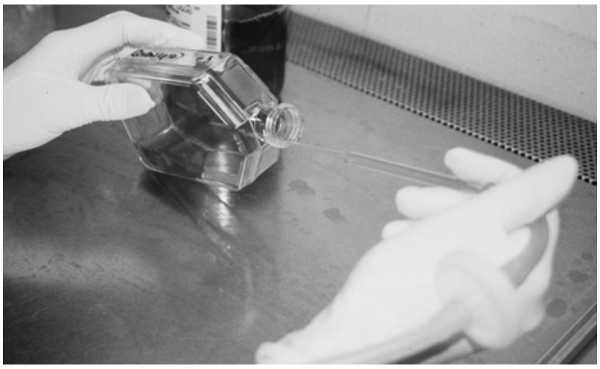
در سینی مرطوب کننده در داخل انکوباتور می‌توان از یک ضد قارچ مثل rocall ٪۲ یا سولفات مس ٪۱ استفاده کرد تا رشد قارچی را به تاخیر اندازد، اما موفقیت چنین ضد قارچ‌هایی محدود به سطوحی می‌باشد که در تماس با آن می‌باشند، وهیچ روش جایگزین به جای تمیز کردن مرتب وجود ندارد. بعضی از انکوباتورها دارای چرخه های استریلیزاسیون با درجه حرارت بالا می باشند اما به ندرت قادر به ایجاد گرمای کافی برای مدت زمان طولانی بوده تا موثر بوده و مدت زمانی که انکوباتور بدون استفاده می باشد ممکن است باعث ایجاد مشکلاتی شود. بعضی از انکوباتورها دارای فیلتراسیون میلی پور و جریان هوای لامینار برای جلوگیری از گردش میکروارگانیسم ها می باشند.

کشت‌های بسته بندی شده

زمانی که مشکلات آلودگی در انکوباتورهای مرطوب دوباره تکرار می‌شود قرار دادن دیش‌ها و پلیت‌ها در جعبه‌های پلاستیکی ساندویچی سودمند می‌باشد. داخل و خارج جعبه را باید قبل از استفاده سواب کرد و سپس اجازه داد تا در معرض هوای استریل خشک شود. مجدداً پس از خارج کردن جعبه از انکوباتور، قبل از این که جعبه باز شود و یا به محیط کار وارد شود باید آن را با الکل ٪۷۰ سواب کرد. سپس با دقت دیش‌ها را خارج کرده و قبل از استفاده مجدد از جعبه، داخل آن را سواب کنید.

گاز دهی با CO_2

قرار دادن فلاسک‌ها با درپوش‌های نیمه باز در یک انکوباتور CO_2 برای امکان تعادل گازی امری متداول است اما اینکار خطر آلودگی را افزایش می‌دهد. چندین شرکت سازنده، فلاسک‌های با درپوش‌های نفوذپذیر تولید می‌کنند که تعادل سریع در CO_2 اتمسفر را بدون خطر آلودگی فراهم می‌سازند. همچنین می توان فلاسک‌ها را با یک مخزن گاز مخلوط استریل تنقیه کرد و سپس در آنها را محکم بست. این کار نیاز به انکوباتور گازدهی شده برای فلاسک‌ها را برطرف ساخته و یکنواخت‌ترین و سریعترین تعادل را برقرار می‌سازد.



شکل ۷-۴: گازدهی یک فلاسک. یک پی پت در خط متصل به مخزن CO_2 جایگزین شده و ٪۵ CO_2 برای خارج کردن هوا از فلاسک بدون ایجاد حباب در محیط کشت استفاده می شود. حرف F نشان دهنده یک فیلتر دارای منافذ ریز در مسیر خط CO_2 می باشد.

فصل پنجم

ظروف کشت و بسترها

بستر (substrate)

اتصال و رشد

اکثر سلولهای مهره‌داران که در شرایط *in vitro* کشت یافته‌اند، بر روی یک بستر مصنوعی به صورت تک‌لایه رشد می‌کنند. بنابراین باید بستر به طور مناسب باردار شده باشد تا اجازه چسبیدن سلولها را داده و یا حداقل امکان چسبیدن فاکتورهای چسبندگی تولید شده توسط خود سلول را فراهم کند تا چسبیدن سلولها و انتشار آنها را امکان‌پذیر سازد. هرچند، رشد خود به خودی در حالت شناور (سوسپانسیون) محدود به رده‌های سلولی خونساز، تومورهای آستروسیت‌های جوندگان و تعداد اندک دیگری از رده‌های سلولی انتخابی از قبیل سرطان ریه کوچک سلول (small-cell lung cancer) *می باشد*، بسیاری از رده‌های سلولی ترانسفورم شده می‌توانند در حالت شناور رشد کرده و بنابراین به بار سطحی بستر وابسته نمی‌باشند. هرچند اغلب سلولهای طبیعی نیاز دارند که برای تکثیر بر روی یک بستر گسترش یابند و انتشار ناکافی به دلیل چسبندگی کم یا ازدحام بیش از حد از تکثیر ممانعت می‌کند. سلولهایی که برای رشد به تکیه‌گاه نیاز دارند، وابسته به تکیه‌گاه (anchorage dependent) گفته می‌شوند؛ سلول‌هایی که ترانسفورم می‌شوند، اغلب غیروابسته به تکیه‌گاه شده و زمانی که همزنی شده یا با محیط های کشت نیمه جامد مثل آگار به حالت شناور نگه داشته می‌شوند، می‌توانند به صورت شناور رشد کنند.

مواد بستر

شیشه: به دلیل خواص نوری و بار سطحی، بستر اصلی می‌باشد اما در بسیاری از آزمایشگاهها، پلاستیک مصنوعی (معمولا پلی‌استیرن) جایگزین آن می‌شود که دارای استحکام بیشتر و خواص نوری بهتری می‌باشد. در حال حاضر، به ندرت از شیشه استفاده می‌شود، هرچند که شیشه ارزان می‌باشد و به راحتی قابل شستشو بوده و بدون اینکه ویژگی‌های حمایت‌کننده از رشد خود را از دست بدهد، به آسانی با حرارت خشک و مرطوب استریل شده و از لحاظ نوری شفاف می‌باشد. تیمار شیشه با بازهای قوی (مثل NaOH یا دترژنت‌های سوزآور)، آنرا تا زمانیکه با یک شستشوی اسیدی خنثی شود برای کشت نامناسب می‌سازد.

پلاستیک یکبار مصرف: فلاسک‌های پلی‌استیرن یکبار مصرف استریل یک بستر مناسب برای کشت می‌باشند. این فلاسک‌ها معمولاً از کیفیت نوری خوبی برخوردار بوده و سطح کشت در آنها مسطح بوده و کشت‌های یکنواخت و قابل تکثیر تک لایه را بوجود می‌آورند. پلی‌استیرن در زمان تولید، هیدروفوب بوده و سطح آن برای رشد سلولی مناسب نمی‌باشد، بنابراین پلاستیک‌های کشت بافت با تخلیه الکتریکی، پلاسمای گازی(gas plasma)، اشعه گاما یا به روش شیمیایی تیمار شده تا یک سطح باردار حاصل شود که قابلیت مرطوب شدن را داشته باشد. به دلیل اینکه محصولات تولیدکننده‌های مختلف از لحاظ کیفی با هم اختلاف دارند، باید نمونه‌هایی از منابع مختلف از لحاظ کارایی پلیتینگ و میزان رشد سلول‌های متداول مورد استفاده در یک محیط کشت حاوی غلظت‌های بهینه و نصف میزان بهینه (half-optimal) سرم و بدون سرم آزمایش شوند (غلظت‌های بالای سرم ممکن است عیوب پلاستیک را بپوشاند).

در حالی که پلی‌استیرن به مراتب ارزانترین و متداولترین بستر پلاستیکی می‌باشد، اما سلولها ممکن است بر روی پلی‌وینیل‌کلراید (PVC)، پلی‌کربنات، پلی‌تترا فلوراتیلن (PTFE)، Melinex، (TPX) Thermanox و تعدادی پلاستیک‌های دیگر رشد یابند. برای آزمودن یک بستر جدید بهتر است که سلولها را روی آن به صورت یک تک‌لایه منظم

رشد داده و سپس سعی کنید با پیش‌تیمار و یا بدون پیش‌تیمار سطح، سلولها را روی آن کلون کنید. PTFE به شکلهای باردار (هیدروفیلیک) و غیرباردار (هیدروفوبیک) وجود دارد؛ شکل باردار را می‌توان برای سلولهای تک‌لایه منظم و کشت ارگانوتایپیک و شکل غیرباردار را برای ماکروفاژها و تعدادی از رده‌های سلولی ترانسفورم شده به کار برد.

انتخاب ظروف کشت

بعضی از ظروف کشت متداول در جدول۱-۵ آورده شده است. بازده مورد انتظار سلولهای HeLa برای هر ظرف کشت ذکر شده است. بازده یک رده سلولی متناهی(مثل فیبروبلاست های دیپلوئید) در حدود یک پنجم سلولهای HeLa می باشد. چندین عامل برای انتخاب ظروف کشت وجود دارد ۱) توده سلولی مورد نیاز ۲) اینکه سلولها به صورت تک‌لایه یا شناور رشد می‌کنند ۳) آیا کشت باید پوشیده بوده و یا در معرض اتمسفر قرار گیرد ۴) فراوانی نمونه‌برداری ۵) نوع تجزیه و تحلیل‌های مورد نیاز ۶) هزینه.

محصول سلولی (cell yield)

در مورد کشت‌های تک لایه، محصول سلولی، متناسب با نواحی سطحی موجود درفلاسک می‌باشد. برای حجم‌های اندک و تکرارهای چندتایی بهترین حالت، استفاده از پلیت‌های چاهک‌دار می‌باشد که می‌تواند تعداد زیادی چاهک داشته باشد

جدول ۱-۵: خصوصیات ظروف کشت

Culture vessel	Replicates	mL	cm²*	Approximate cell yield (HeLa)
Multiwell plates				
Microtitration	96	0.1	0.3	1×10^5
Microtitration	144	0.1	0.3	1×10^5
4-well plate	4	2	2	5×10^5
6-well plate	6	2	10	2×10^6
12-well plate	12	1	3	7.5×10^5
24-well plate	24	1	2	5×10^5
Petri dishes				
3.5-cm diameter	1	2	8	2×10^6
5-cm diameter	1	4	17.5	4×10^6
6-cm diameter	1	5	21	5×10^6
9-cm diameter	1	10	49	1×10^7
Flasks				
10 cm² (T10)	1	2	10	2×10^6
25 cm² (T25)	1	5	25	5×10^6
75 cm² (T75)	1	25	75	2×10^7
175 cm² (T175)	1	75	175	5×10^7
225 cm² (T225)	1	100	225	6×10^7
Roller bottle	1	200	850	2.5×10^8
Stirrer bottles				
500 mL (unsparged)	1	50		5×10^7
5000 mL (sparged)	1	4000		4×10^9

*These figures are approximate; actual areas will vary by source.

[مثلاً پلیت‌های میکروتیتراسیون ۹۶ یا ۱۴۴ خانه با ۰/۲mL– ۰/۱ محیط کشت و ۰/۲۵cm² سطح رشد یا دیش‌های خوشه‌ای (cluster dishes) ۲۴ خانه با mL ۲-۱ محیط کشت در هر چاهک و۱/۷۵cm² سطح رشد] یا پلیت‌های ۴ خانه که قطر هر چاهک ۵cm بوده و ۵mL محیط کشت در هر چاهک استفاده می‌شود. پتری دیش‌ها و فلاسک‌های از ۱۰cm² تا ۲۲۵cm² در محدوده اندازه متوسط می‌باشند. فلاسک‌ها بیشتر با ناحیه سطحی‌شان شناخته می‌شوند (مثلاً ۲۵ cm² یا ۱۷۵ cm² یا گاهی اوقات به ترتیب T_{25} یا T_{175} در صورتی که پتری‌دیش‌ها با اندازه قطرشان شناخته می‌شوند (مثلاً ۳/۵cm یا ۹cm).

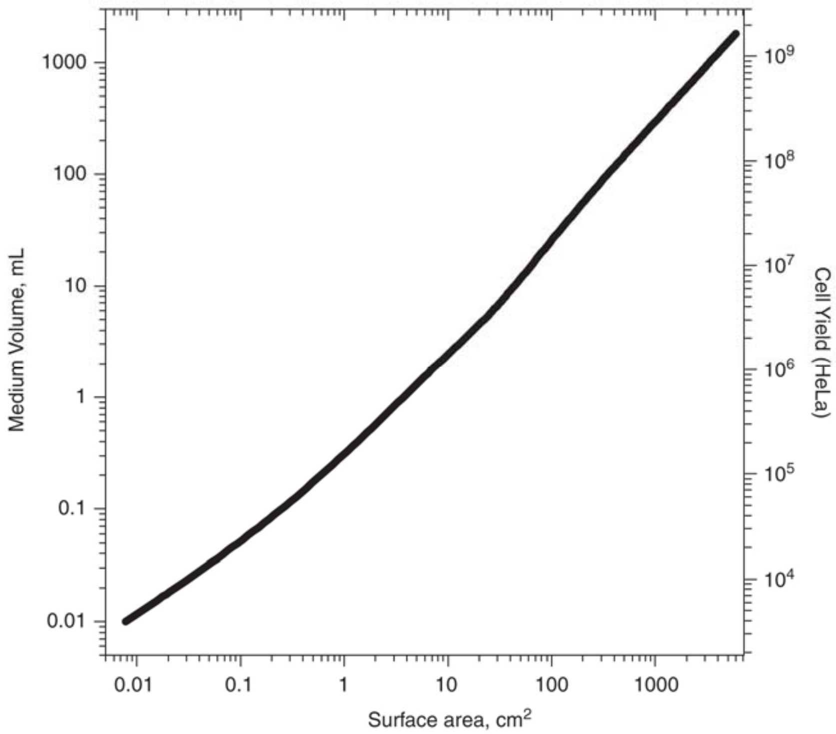
بطریهای شیشه‌ای نسبت به انواع پلاستیکی متغیرتر می‌باشند زیرا معمولاً از لوازم دارویی استاندارد به دست می‌آیند. بطری‌های شیشه‌ای باید دارای:

۱) یک سطح کاملاً مسطح
۲) یک درپوش پیچدار عمیق با یک پوشش مناسب و آستر غیرسمی و
۳) شانه های با شیب کم (shallow-shopping shoulders) برای تسهیل جمع‌آوری سلول‌های تک لایه پس از تریپسینه کردن و به منظور افزایش کارایی شستشو باشند.

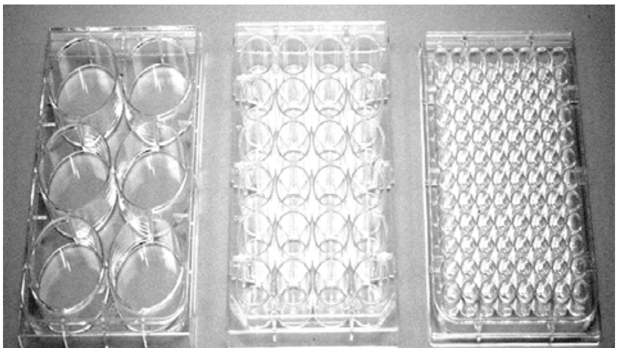
در صورتی که میزان زیادی محصول سلولی نیاز دارید (مثلاً حدود ۱۰⁹ سلول HeLa یا ۱۰⁸ × ۲ سلول MCR-5) استفاده از بطری‌های متداول به دلیل حجم و تعداد آنها پر زحمت بوده و به ظروف خاص نیاز می‌باشد. فلاسک‌هایی که دارای سطوح چین‌خورده (موج‌دار) می‌باشند یا فلاسک‌های چند لایه، باعث افزایش ناحیه سطحی می‌شوند. محصول سلولی بیش از این به تکثیر کننده چند سطحی یا بطری‌های غلتان بر روی رک‌های مخصوص نیاز دارد. برای افزایش محصول سلولی در مورد سلول‌هایی که در حالت شناور رشد می‌یابند، تا زمانی که سلول‌ها در کشت عمیق همزنی شده و با هوای حاوی ۵٪ CO_2 هوادهی می‌شوند فقط به افزایش حجم محیط کشت نیاز می‌باشد.

کشت‌های سوسپانسیون

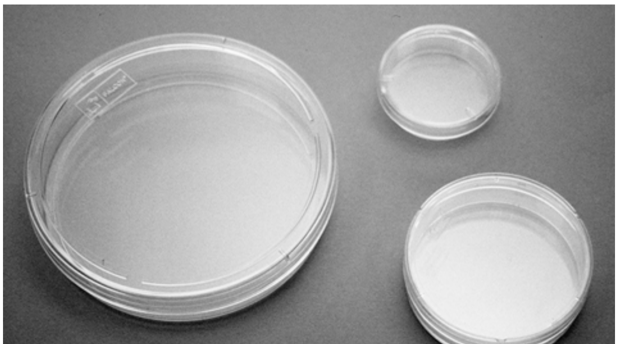
سلول‌هایی که به صورت شناور رشد می‌کنند را می‌توان در هر نوعی از فلاسک، پلیت یا پتری‌دیش استریل رشد داد اما نیازی به تیمار آنها برای اتصال سلولی نمی‌باشد. بطری‌های دارای همزن زمانی استفاده می‌شوند که لازم است سلول‌ها با همزدن درحالت شناور باقی بمانند. این بطری‌ها در اندازه‌های مختلف و معمولاً به صورت شیشه‌ای وجود دارند. معمولاً عمل همزدن توسط یک چرخ پره‌دار حاوی یک دانه مغناطیسی صورت می‌گیرد که چرخش آن توسط یک همزن مغناطیسی انجام می‌شود. باید سرعت چرخش پایین و تقریباً حدود



شکل ۱-۵: راندمان سلولی و منطقه سطحی. رابطه حجم محیط کشت و راندمان سلولی با منطقه سطحی یک ظرف کشت. نمودار برحسب حجم محیط کشت برای اندازه های مختلف ظروف رسم شده و به صورت غیر خطی می باشد زیرا در ظروف کوچکتر محیط کشت نسبتاً بیشتری در مقایسه با ظروف بزرگتر استفاده می شود. راندمان سلولی براساس حجم محیط کشت بوده و تقریبی می باشد.

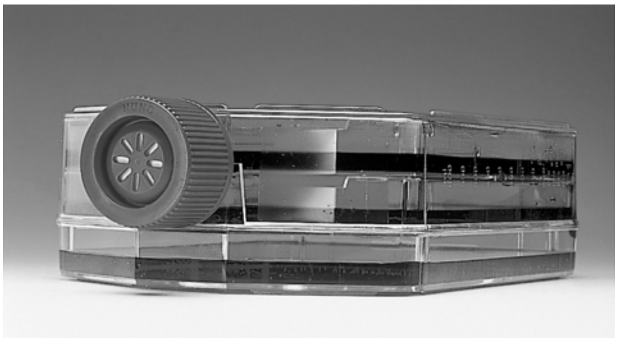


شکل ۲-۵: پلیت های چاهک دار. پلیت های ۶ خانه، ۲۴ خانه و ۹۶ خانه(میکروتیترواسیون). محدوده گسترده ای از پلیت ها با تعداد چاهک های متفاوت از ۴ تا ۱۴۴ چاهک موجود می باشد.



شکل ۳-۵: پتری دیش ها. پلیت های نشان داده شده در شکل دارای قطر ۳/۵ cm، ۵ cm و ۹ cm می باشند. همچنین پتری دیش های چهارگوش با ابعاد ۹×۹ cm موجود می باشد. یک الگوی مشبک برای کمک در بررسی دیش مثلاً در شمارش کلنی ها را می توان تهیه کرد اما ممکن است با شمارش اتوماتیک کلنی ها تداخل یابد.

شکل ۴-۵: فلاسک های پلاستیکی. اندازه های نشان داده شده ۱۰ cm^2، ۲۵ cm^2، ۷۵ cm^2 و ۱۸۵ cm^2 می باشند.



شکل ۵-۵: فلاسک های چند سطحی. فلاسک سه سطحی Nunc با سه سطح رشد ۸۰ cm^2 که به طور همزمان بذرافشانی می شوند. هرچند که سطح رشد ۲۴۰ cm^2 می باشد، عمق آن معادل یک فلاسک ۸۰ cm^2 معمولی می باشد. چون فاصله بالایی برای فاز گازی کوچکتر می باشد، بهتر است که این فلاسک با درپوش فیلتردار در یک انکوباتور CO_2 استفاده شود.

۶۰rpm نگه داشته شود تا از آسیب ناشی از فشار برشی جلوگیری شود. معمولاً برای به حداقل رساندن برش، طرح پاندول ترجیح داده می‌شود. کشت‌های سوسپانسیون را می‌توان به صورت چند تکرار تهیه کرد یا می‌توان به صورت تکراری از یک فلاسک نمونه‌برداری کرد. همچنین می‌توان با افزودن و خارج کردن محیط کشت به صورت پیوسته، آنها را در یک حالت پیوسته و یکنواخت نگه داشت.

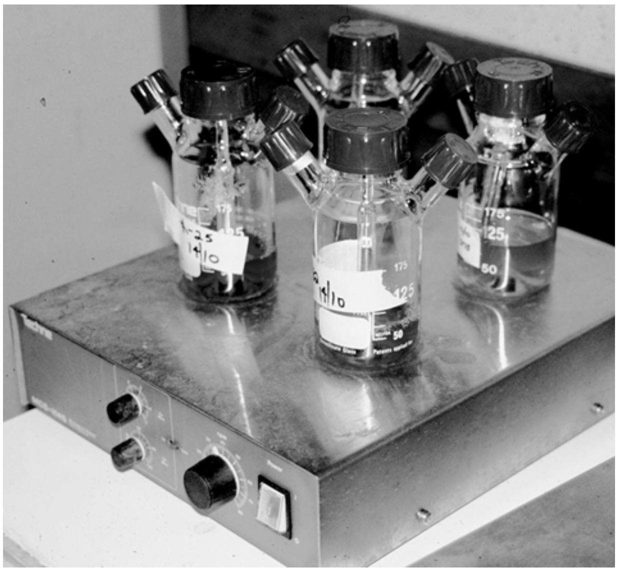
تهویه کردن (venting)

دیش‌ها و پتری‌دیش‌های چند خانه که برای نمونه‌برداری تکراری یا کلونینگ انتخاب می‌شوند، دارای سرپوش‌های شل بوده تا دسترسی به دیش‌ها آسانتر شود. بنابراین این گونه دیش‌ها کاملاً بسته نبوده و به یک اتمسفر مرطوب و فشار CO_2 کنترل شده نیاز دارند. چون ممکن است لایه نازکی از مایع در اطراف سطح داخلی درپوش ایجاد شده و تا حدودی بعضی از دیش‌ها را مهر و موم کند، باید از درپوش‌های منفذداری استفاده شود که دارای تهویه می‌باشند. در صورتی که لازم باشد به طور کامل مهر و موم شود می‌توان بعضی از دیش‌های چندخانه را با نوارهای چسبنده مهر و موم کرد.

ممکن است برای تهویه فلاسک‌ها، درپوش آنها را به اندازه یک دور کامل شل کرد. در این روش امکان تبادل CO_2 (در یک انکوباتور CO_2) از خارج به داخل فلاسک و در رده‌های سلولی که مقدار زیادی اسید تولید می‌کنند، از داخل به خارج فلاسک وجود دارد. درپوش هایی که فیلتر نفوذپذیر دارند و شرایط تعادل با فاز گازی را فراهم می کنند (علیرغم گرانی) ترجیح داده می شوند چون اجازه انتشار CO_2 بدون خطر آلودگی را فراهم می سازند.

نمونه‌برداری و تجزیه و تحلیل

در صورتی که همه نمونه به طور همزمان برداشته شده و به طور یکسان عمل‌آوری شوند، پلیت‌های چند خانه برای کشت‌های تکراری ایده‌ال می‌باشند. به عبارت دیگر در صورتی که لازم باشد تا نمونه‌برداری در زمان‌های مختلف انجام شده و بلافاصله نمونه‌ها عمل‌آوری شوند، ممکن است ترجیح داده شود تا از ظروف مجزا (فلاسک‌ها، لوله‌های آزمایش و غیره) استفاده شود. در پلیت‌های میکروتیتراسیون می‌توان با برش و خارج کردن فقط قسمتی از پوشش پلیت چسبنده که چاهک‌ها



شکل ۶-۵: فلاسک های همزن دار کوچک. چهار فلاسک همزن دار کوچک با ظرفیت ۲۵۰mL و دارای ۱۰۰-۵۰ mL محیط کشت بر روی رک همزن دار دارای چهار جایگاه. فلاسک های بزرگتر تا حجم ۱۰ لیتر موجود می باشند.

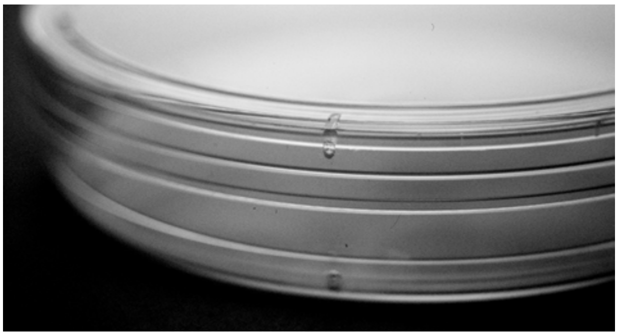
زیر آن قرار گرفته، از چاهک‌های اختصاصی نمونه‌برداری کرد. همچنین پلیت‌های میکروتیتراسیونی وجود دارد که می‌توان برای کارهای خاصی چاهک‌ها را از آن جداسازی کرد، هر چند در صورتی که می‌خواهید از آن برای سلول‌های چسبنده استفاده کنید باید مطمئن شود که چاهک‌ها برای کشت سلولی تیمار شده‌اند.

مشاهدات میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی کم با استفاده از میکروسکوپ معکوس به آسانی بر روی فلاسک‌ها، پتری دیش‌ها و پلیت‌های چند خانه انجام می‌شود. هر چند با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست، ممکن است به دلیل اندازه هلال (meniscus) مشکلاتی درمشاهده پلیت‌های میکروتیتراسیون به وجود آید؛ حتی در پلیت‌های ۲۴ خانه، با میکروسکوپ فارکنتراست فقط می‌توان مرکز هر چاهک را به طور رضایت‌بخش مشاهده کرد. در صورتی که مشاهدات میکروسکوپی نقش مهمی در آنالیزهای شما داشته باشند، ممکن است استفاده از یک لام حفره دار (chamber slide) مفید باشد. در مورد بطری‌های غلتان بزرگ مشکلاتی برای بعضی از میکروسکوپ‌ها به وجود می‌آید. معمولاً لازم است که کندانسور را برداریم که در این مورد دیگر فازکنتراست را در اختیار نخواهیم داشت.

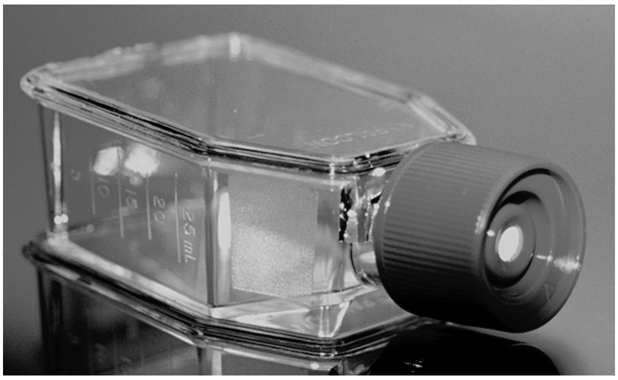
در صورتی که برای فرآوری نمونه، به استخراج در استون، تولوئن، اتیل استات یا حلال‌های آلی مشخص دیگر نیاز باشد، به دلیل حلالیت پلی استیرن مشکل تازه‌ای به وجود خواهد آمد. چون این مشکل اغلب به دلیل حلال‌های آلی مورد استفاده در روش‌های بافت‌شناسی می‌باشد، LUX(Bayer, ICN) لامل‌های پلاستیکی Thermanox مقاوم به مواد حلال (TPX) را تولید کرده که برای مطالعات بافت‌شناسی مناسب بوده و در دیش‌های چند خانه متداول فیت می‌شوند (که نیاز نیست از گرید کشت بافت باشند). هر چند این لامل‌ها کیفیت نوری پایینی داشته و باید آنها را در حالی که سلول‌ها به سمت بالا باشند روی یک لام قرار داده و سپس یک لام شیشه‌ای روی آن قرار داد.

رشد غیر یکنواخت

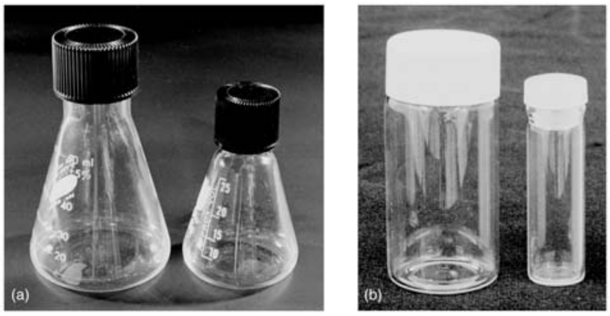
گاهی اوقات، سهواً سلول‌ها به صورت غیریکنواخت در عرض سطح رشد توزیع می‌شوند. نوسان حاصل از باز و بسته کردن انکوباتور، نقص در موتور فن یا لرزش تجهیزات می‌تواند منجر به تولید موج‌هایی در فلاسک شود که در نهایت باعث ایجاد الگوی موجی در تک لایه شده و تغییراتی را در دانسیته سلولی ایجاد می‌کند. برطرف کردن نوسانات و به حداقل رساندن تعداد دفعات باز و بسته کردن انکوباتور، به کاهش رشد غیریکنواخت کمک می‌کند. همچنین قرار دادن یک وزنه سنگین در سینی یا جعبه به همراه پلیت‌ها و مجزاسازی آن از قفسه با فوم پلاستیکی ممکن است به کاهش مشکل کمک کند،



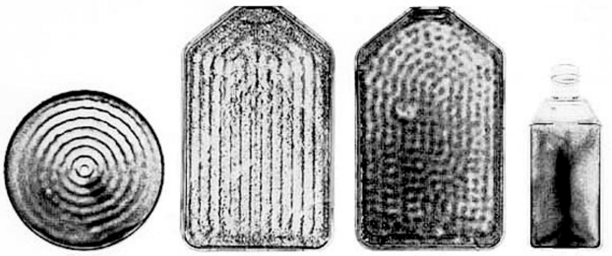
شکل ۷-۵: پتری دیش های دارای منفذ. برآمدگی های کوچک درپوش را بالا نگهداشته و از ایجاد یک لایه نازک مایع و کاهش میزان تبادلات گازی جلوگیری می کند.



شکل ۸-۵: فلاسک های دارای منفذ. درپوش نفوذپذیر نسبت به گاز بر روی فلاسک ۱۰cm^2.



شکل ۹-۵: ویالها و فلاسک های دارای درپوش های پیچی. (a) فلاسک های شیشه ای که برای کشت های تکراری یا ذخیره سازی نمونه ها مناسب می باشد. (b) ویالهای سنتیلاسیون مخصوصاً برای مطالعات الحاق ایزوتوپ مفید می باشد اما بعد از استفاده با مایع سنتیلاسیون نباید برای کشت استفاده شوند.



شکل ۱۰-۵: رشد غیر تصادفی. نمونه هایی از برآمدگی های کشت تک لایه در دیش ها و فلاسک ها که به علت نوسان حاصل از موتور فن انکوباتور یا به دلیل باز و بسته کردن درهای انکوباتور به وجود می آید.

اما برای شستشو و استریل کردن چنین صفحه فومی باید توجه زیادی صورت پذیرد، زیرا در غیر این صورت منجر به آلودگی شدید خواهد شد.

هزینه

هزینه همیشه باید در توازن با آسودگی باشد. مثلاً پتری‌دیش‌ها ارزان‌تر از فلاسک‌های دارای ناحیه سطحی یکسان می‌باشند اما به شرایط کنترل شده CO_2 و رطوبت نیاز داشته و بیشتر مستعد به آلودگی می‌باشند. هرچند آزمایش و فراوری آنها آسان‌تر است.

گمان می‌رود بطری‌های شیشه‌ای سودا ارزان قیمت که همیشه هم از کیفیت نوری مناسبی برخوردار نمی‌باشند اغلب از پیرکس با گرید بالاتر یا شیشه‌های شفاف که معمولاً حاوی سرب هستند، برای کشت بهتر می‌باشند. یک عیب عمده شیشه این است که آماده‌سازی آن پر زحمت می‌باشد چرا که قبل از استفاده مجدد باید با دقت شستشو و استریل شود. در حال حاضر، به دلیل راحتی کار، شفافیت نوری و کیفیت از پلاستیک استفاده می‌شود.

سطوح تیمار شده

لایه‌های تغذیه کننده (Feeder layers)

هر چند ماتریکس پوشاننده می تواند به چسبیدن، رشد و تمایز سلولها کمک کند، برای کشت بعضی از سلول‌های سخت رشد، بخصوص در دانسیته‌های سلولی پایین، به پشتیبانی سلول‌های زنده (مثلاً فیبروبلاست‌های جنین موش) نیاز می‌باشد. این عمل تا حدودی به دلیل تکمیل (supplementation) محیط کشت با تراوش متابولیت‌ها یا ترشح فاکتورهای رشد از فیبروبلاست‌ها می‌باشد، اما همچنین ممکن است به دلیل شرطی کردن (conditioning) بستر توسط محصولات سلولی باشد. لایه‌های تغذیه کننده که به صورت یک تک لایه متراکم رشد می‌کنند، ممکن است سطح را برای اتصال سایر سلول‌ها مساعد و یا حتی انتخابی کنند. بقاء (survival) و توسعه جوانه های نرونی (neuritis) نرون‌های مرکزی و محیطی را می‌توان با کشت نرون‌ها بر روی یک تک لایه از سلول‌های گلیا افزایش داد، هر چند در این مورد به جای تماس سلولی مستقیم، تأثیر وابسته به یک فاکتور قابل انتشار می‌باشد.

پس از این که یک کشت تک لایه به تراکم رسید، تکثیر بعدی باعث می‌شود که سلول‌ها از بستر مصنوعی جدا شده و بر روی سطح تک لایه مهاجرت کنند. مورفولوژی سلول‌ها ممکن است تغییر کند: ممکن است سلول‌ها انتشار کمتری یافته، متراکم‌تر شده و تمایز بیشتری یابند. ظاهراً برهمکنش سلول با لایه سلولی زیرین از برهمکنش سلول با یک بستر مصنوعی متفاوت می‌باشد. مورد اول می‌تواند منجر به یک تغییر در مورفولوژی شده و توان سلول‌ها برای تکثیر را کم کند.

قالب‌های سه بعدی (three-dimensional matrices)

در طی کشت متوالی، به دلیل فقدان ساختمان سه بعدی بافت و برهمکنش‌های سلول ـ سلول بسیاری از خصوصیات عملکردی و مورفولوژی از بین می‌رود. این نقایص منجر به ابداع قالب‌های سه بعدی از قبیل ژل کلاژن، اسفنج سلولزی (به صورت تنها یا پوشیده شده با کلاژن) یا Gelfoam گردید. لخته‌های فیبرین یکی از اولین محیط کشت‌های مورد استفاده برای کشت اولیه بوده و هنوز هم به صورت لخته‌های پلاسما خام یا به صورت فیبرینوژن خالص‌سازی شده مخلوط با ترومبین استفاده می‌شود. هر دو سیستم یک ژل سه بعدی را تولید کرده که در آن سلول‌ها می‌توانند در حدفاصل ژل ـ ماده جامد یا در داخل ژل مهاجرت و رشد کنند.

قالب‌های سه بعدی به طور گسترده‌ای در مهندسی بافت استفاده می‌شوند و به صورت غیرآلی مثل فسفات کلسیم و یا آلی مثل Gelfoam می‌باشند. چنین قالب‌ها یا داربست‌ها (scaffolds) علاوه بر این که اجازه اتصال، تکثیر و تمایز سلول‌ها را می‌دهند، همچنین لازم است که در *in vivo* تجزیه شده و توسط قالب اندوژنوس جایگزین شوند. میکروکریرهای ساخته شده از پلی‌استیرن (Nalge Nunc)، سفادکس، پلی اکریل آمید و کلاژن یا ژلاتین به شکل دانه‌ای برای تکثیر سلول‌های وابسته به تکیه‌گاه در حالت سوسپانسیون موجود می‌باشد.

بسترهای فلزی (metallic substrates)

ممکن است سلول‌ها روی صفحات فولاد زد زنگ یا سطح فلزی دیگری رشد داده شوند. مشاهده سلول‌ها روی یک بستر

مات(opaque) نیازمند میکروسکوپ‌های تداخلی surface) interference microscopy) می‌باشد مگر این که از لایه‌های فلزی بسیار نازک استفاده شود.

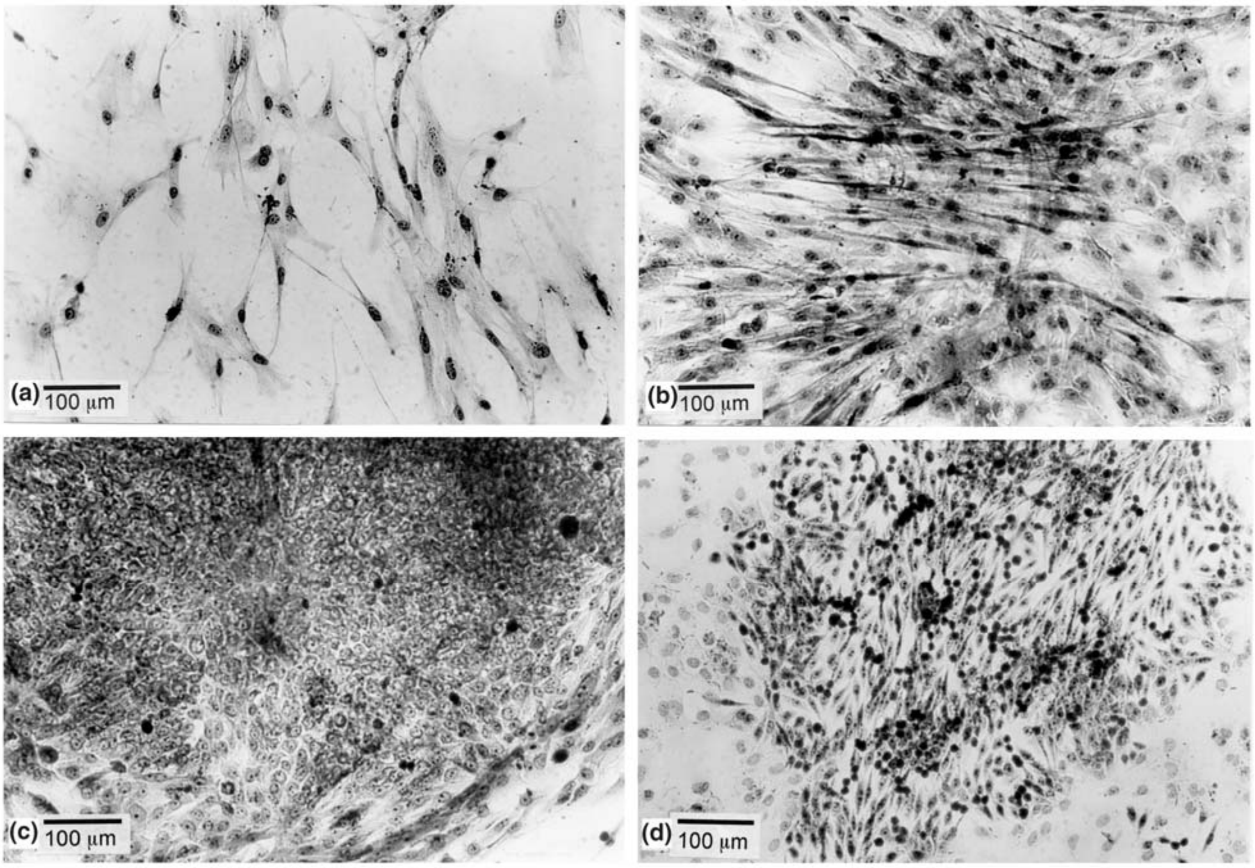
بسترهای غیرچسبنده

گاهی اوقات اتصال سلول‌ها نامطلوب است. انتخاب کلنی‌های ترانسفورم شده با ویروس که غیروابسته به تکیه‌گاه می‌باشند را می‌توان با کشت سلول‌ها روی آگار انجام داد، زیرا سلول‌های غیردگرگون شده قادر نمی‌باشند در این ماتریکس به آسانی کلنی تشکیل دهند. در چنین سیستمی دو اصل کلی وجود دارد:

۱- جلوگیری از اتصال در پایه دیش، جایی که گسترش و رشد وابسته به تکیه‌گاه رخ می‌دهد.

۲- ایموبیلیزاسیون سلول‌ها به گونه‌ای که سلول‌های دختری حتی اگر غیرچسبنده باشند، همراه کلنی باقی می‌مانند. اغلب، آگار، آگارز یا متوسل (متیل سلولز با ویسکوزیته ۴۰۰۰cP) استفاده می‌شود. دو تای اولی ژل بوده و سومی یک سل با ویسکوزیته بالا می‌باشد. چون متوسل یک سل است، سلول‌ها به آرامی در آن ته‌نشین خواهند شد. بنابراین با یک زیرلایه آگار استفاده می‌شود. دیش‌هایی که از گرید کشت بافت نمی‌باشند را می‌توان بدون استفاده از یک زیرلایه آگار استفاده کرد اما ممکن است مقداری اتصال و انتشار رخ دهد.

شکل ۱۱-۵: کشت های فیبر توخالی. یک دسته از فیبرهای تو خالی از پلاستیک نفوذپذیر در یک محفظه خارجی از جنس پلاستیک شفاف محصور شده و از هر دو طرف برای سلولهای بذرافشانی شده در دسترس می باشد.



شکل ۱۲-۵: ریخت شناسی بر روی لایه های تغذیه کننده. تغییر ریخت شناسی در سلولهایی که بر روی لایه های تغذیه کننده رشد می کنند: فیبروبلاست های کارسینومای سینه انسان. (a) رشد کرده بر روی پلاستیک و (b) رشد یافته بر روی یک لایه تغذیه کننده متراکم از سلولهای روده جنین انسان. سلولهای اپی تلیال کارسینوما سینه انسان رشد یافته (c) بر روی پلاستیک و (d) بر روی لایه تغذیه کننده مشابه همانند (b).

فصل ششم

محیط‌های کشت تعریف شده و مکمل‌ها

تکامل محیط‌های کشت

تلاش‌های اولیه برای کشت سلول‌ها در محیط‌های طبیعی حاصل از عصاره‌های بافتی و مایعات بدن از قبیل عصاره جنین جوجه، سرم، لنف و غیره صورت پذیرفت. با افزایش رده‌های سلولی، تقاضا برای مقادیر بیشتری از یک محیط کشت که از لحاظ کیفی ثابت‌تر باشد، منجر به ابداع محیط‌های کشت شیمیایی براساس تجزیه و تحلیل مایعات بدن و بیوشیمی تغذیه‌ای گردید. محیط‌های کشت پایه Eagle و سپس محیط کشت Eagle's Minimal Essential به طور گسترده‌ای با سرم گاو، انسان یا اسب، ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها و عصاره جنین به اشکال مختلف تکمیل شد. چون رده‌های سلولی پیوسته بیشتری در دسترس قرار گرفتند (سلول‌های L929، HeLa و غیره) آشکار بود که این محیط‌های کشت برای اکثر این رده‌ها به طور کامل، مناسب بود و اغلب تکامل‌های موفقیت‌آمیز مرهون جایگزینی سرم، بهینه کردن محیط‌های کشت برای انواع سلولی مختلف (مثلاً RPMI 1640 برای رده‌های سلولی Lymphoblastoid)، یا تغییر دادن برای شرایط خاص (مثلاً Leibovitz L15 برای حذف نیاز به افزودن CO_2 و $NaHCO_3$) می‌باشد.

جداسازی و تکثیر سلولهای یک دودمان خاص ممکن است نیازمند یک محیط کشت فاقد سرم انتخابی باشد، در حالیکه سلولهایی که برای تولید محصولات مثلاً بعنوان میزبان برای تکثیر سلولی یا برای مطالعات ملکولی غیر اختصاصی برای سلول رشد داده می شوند، به طور عمده بر اساس محیط های کشت Dulbecco ،Eagle's MEM تغییر یافته محیط کشت DMEM ،Eagle و یا به طور فزاینده RPMI 1640 تکمیل شده با سرم می باشند. هر چند اکنون بسیاری از تولیدهای در مقیاس صنعتی برای تسهیل عمل آوری پایین دستی و کاهش خطر عوامل عفونی از محیط های کشت فاقد سرم استفاده می کنند. همچنین یک گرایش رو به افزایش برای تأثیر یک حالت سازش با مخلوط کردن یک محیط کشت پیچیده مثل Ham's F12 با یک محیط کشت دارای غلظت‌های بیشتری از اسید آمینه و ویتامین مثل DMEM وجود دارد. این کار خالص سازی را مشکلتر می سازد اما یک محیط کشت مفید همه منظوره برای کشت اولیه و همچنین تکثیر رده سلولی فراهم می سازد.

خواص فیزیکوشیمیایی

pH : بیشتر رده‌های سلولی در pH ۷/۴ به خوبی رشد می‌کنند. هر چند pH بهینه برای رشد سلولی در میان سویه‌های سلولی مختلف کمی متفاوت می‌باشد، بعضی از رده‌های سلولی فیبروبلاست نرمال در pH ۷/۷-۷/۴ بهترین رشد را داشته و سلول‌های ترانسفورم شده ممکن است در pH ۷/۴-۷ بهتر رشد کنند. گزارش شده است که می‌توان سلول‌های اپیدرمی را در pH ۵/۵ نگهداری کرد اما این سطح به طور عمومی پذیرفته نشده است. ممکن است در مواردی خاص انجام یک آزمایش رشد مختصر و یا یک آنالیز عملکرد خاص برای تعیین pH بهینه مفید باشد.

معمولاً فنل رد به عنوان نشانگر استفاده می‌شود. فنل رد در pH ۷/۴ قرمز بوده و در pH ۷ نارنجی، در pH ۶/۵ زرد، در pH کمتر از ۶/۵ زرد لیمویی، در pH ۷/۶ صورتی پر رنگ و در pH ۷/۸ ارغوانی می‌شود. چون ارزیابی رنگ به میزان زیادی ذهنی می‌باشد، بهتر است مجموعه‌ای از استانداردها با استفاده از یک محلول نمکی متعادل شده استریل(BSS) و فنل رد با غلظت صحیح و در داخل بطری‌های مشابه با مقدار

مشابهی از فضای خالی هوا که شما معمولاً برای تهیه محیط‌های کشت استفاده می‌کنید، ساخته شود.

دستور کار ۱-۶- تهیه استانداردهای pH

مواد

استریل:

محلول نمکی متعادل شده Hank (HBSS)، یا Eagle's MEM با غلظت ×۱۰، بدون بی‌کربنات یا گلوکز با HEPES ۲۰mM ۱۰mL

آب بسیار خالص (UPW) ۹۰mL

سود ۱N ۱۰mL

ظروف یونیورسال ۳۰mL ۷

فلاسک کشت ۲۵cm^2 .... ۷

سرسمپلر ۱۰۰ µL

غیر استریل:

pH متر

سمپلر ۱۰-۱۰۰µL

دستور کار

۱- HBSS را در ۶/۵ pH یا پایین‌تر ساخته و ۱۰mL از آنرا در داخل هر یک از هفت بطری توزیع کنید.

۲- اجازه دهید که با هوا به مدت ۳۰ دقیقه به تعادل برسد.

۳- pH را با سود ۱N در ۶/۵، ۶/۸، ۷، ۷/۲، ۷/۴، ۷/۶ و ۷/۸ تنظیم کرده و سپس با pH متر چک کنید.

۴- ۵mL از HBSS را با فیلتر کردن در فلاسک‌ها استریل کنید. از ۵mL اول برای شستشوی فیلتر استفاده کنید قبل از این که ۵mL دوم را در فلاسک فیلتر کنید.

۵- در فلاسک‌ها را محکم ببندید.

CO_2 و بیکربنات

دی اکسید کربن فاز گازی در محیط کشت حل شده و با یون‌های HCO_3^- تعادل برقرار کرده و pH را کاهش می‌دهد. چون CO_2 حل شده، HCO_3^- و pH به هم وابسته می‌باشند، تعیین اثر مستقیم اصلی CO_2 مشکل می‌باشد. فشار CO_2 اتمسفری، غلظت CO_2 حل شده را مستقیماً با توجه به درجه حرارت تنظیم خواهد کرد. این تنظیم، تولید H_2CO_3 کرده که طبق واکنش زیر تجزیه می‌شود:

$$H_2O + CO_2 \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^- \quad (۱)$$

چون HCO_3^- در مقایسه با اغلب کاتیون‌های موجود دارای یک ثابت تجزیه نسبتاً پایین می‌باشد، مجدداً به هم ملحق شده و محیط کشت اسیدی می‌ماند. نتیجه افزایش CO_2 اتمسفری، کاهش pH می‌باشد، بنابراین تأثیر افزایش فشار CO_2 توسط افزایش غلظت بیکربنات خنثی می‌شود:

$$NaHCO_3 \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^- \quad (۲)$$

افزایش غلظت HCO_3^- معادله (۱) را به سمت چپ هدایت کرده تا تعادل به ۷/۴ pH برسد. اگر باز دیگری (مثل NaOH) استفاده شود، نتیجه خالص به صورت زیر می‌باشد: (۳)

$$NaOH + H_2CO_3 \rightleftharpoons NaHCO_3 + H_2O \rightleftharpoons Na^+ + HCO_3^- + H_2O$$

غلظت‌های $NaHCO_3$ معادل که معمولاً با فشارهای مختلف CO_2 استفاده می‌شود در جدول‌های ۱-۶، ۲-۶ و ۳-۶ ذکر شده است. ممکن است مقادیر متوسطی از CO_2 و HCO_3^- به کار رود، به شرط این که غلظت هر دو متناسب با هم تغییر کند. وقتی یک محیط کشت را برای اولین بار تهیه می‌کنید، مقدار معین از بی‌کربنات و سپس مقدار کافی سود ۱N اضافه کرده به گونه‌ایکه بعد از انکوباسیون در دمای ۳۷°C به مدت یک شب، محیط کشت در pH موردنظر به تعادل برسد. وقتی که با محیط کشتی که درغلظت کاری می‌باشد سر و کار دارید، میزان HCO_3^- را تغییر داده تا با فاز گازی سازگار شده (جدول ۱-۶) و محیط کشت را به مدت یک شب نگهداشته تا در دمای ۳۷°C به تعادل برسد. هر محیط کشتی یک غلظت بی‌کربنات و فشار CO_2 پیشنهادی برای ایجاد pH و اسمولالیتی مناسب دارد اما ممکن است در روش‌های مختلف تهیه، تغییرات اندکی رخ دهد.

با ابداع بافرهای Good (مثل HEPES و Tricine) در کشت بافت تصور شد که چون دیگر CO_2 برای ثابت نگه داشتن pH مورد نیاز نمی‌باشد، می‌توان آن را حذف کرد. ثابت شد که این امر حداقل برای تعداد زیادی از انواع سلول‌ها به خصوص در غلظت‌های سلولی پایین، نادرست می‌باشد. هر چند HEPES ۲۰mM قادر به کنترل pH در محدوده فیزیولوژیکی می‌باشد، عدم حضور CO_2 اتمسفری باعث می‌شود که معادله (۱) به سمت چپ رفته و در نهایت CO_2 حل شده و سرانجام HCO_3^- از محیط کشت حذف می‌شود. به نظر می‌رسد این گروه از حوادث مرتبط، رشد سلولی را محدود می‌کند، هر چند اینکه آیا سلول‌ها به CO_2 یا HCO_3 حل شده (یا هر دو) نیاز دارند، مشخص نمی‌باشد. غلظت‌های پیشنهادی HCO_3^-، CO_2 و HEPES در جدول ۱-۶ آورده شده است.

ورود پیروات در محیط کشت، سلول‌ها را قادر به افزایش تولید داخلی CO_2 کرده و آنها را غیروابسته به CO_2 خارجی و

همچنین HCO_3^- می‌سازد. محیط کشت Leibovitz L15 حاوی غلظت بالاتری از پیروات سدیم (۵۵۰mg/L) بوده اما فاقد $NaHCO_3$ می‌باشد و به CO_2 درفاز گازی نیاز ندارد. خاصیت بافری از طریق غلظت‌های نسبتاً بالای اسیدهای آمینه فراهم می‌شود. چون L15 به CO_2 نیازی ندارد، گاهی اوقات برای جمع‌آوری نمونه‌های بیوپسی پیشنهاد می‌شود. همچنین سدیم β- گلیسرو فسفات برای بافری کردن محیط‌های کشت قابل اتوکلاو که فاقد CO_2 و HCO_3^- می‌باشند، استفاده می‌شود. در صورتی که حذف CO_2 از لحاظ صرفه‌جویی در هزینه‌ها، راحتی کار و یا به دلیل دیگر مهم باشد، ممکن است در نظر گرفتن یکی از این فرمولاسیون‌ها البته فقط بعد از آزمایش مناسب با ارزش باشد.

در کل لازم است که کشت‌های در ظروف در باز در یک اتمسفر CO_2 در غلظتی که در تعادل با بی‌کربنات سدیم در محیط کشت باشد، انکوبه شوند. سلول‌ها در غلظت‌های نسبتاً بالا ($\geq 1 \times 10^5$ cells/mL) و رشد یافته در فلاسک‌های دربسته، نیازی به افزون CO_2 به فاز گازی ندارند به شرط این که غلظت بی‌کربنات پایین (~۴ mM) نگهداشته شود، مخصوصاً اگر سلول‌ها تولید کننده اسید زیاد باشند. هر چند در غلظت‌های پایین (مثلاً در طی کلونینگ) و در بعضی از کشت‌های اولیه، لازم است که CO_2 به فاز گازی فلاسک‌های در بسته افزوده شود. وقتی که به هوادهی نیاز باشد برای امکان تعادل CO_2 یا خارج شدن آن درتولید کننده‌های اسید زیاد، لازم است که درپوش شل بوده و یا از درپوش‌های نفوذپذیر نسبت به CO_2 استفاده شود (Nalge Nunc, Falcon, Corning).

بافرینگ

محیط‌های کشت باید تحت دو مجموعه از شرایط بافری شوند:

۱) دیش‌های باز، که در آنها افزایش تدریجی CO_2 منجر به افزایش pH می‌شود.

۲) تولید بیش از حد CO_2 و اسید لاکتیک در رده‌های سلولی ترانسفورم شده در غلظت‌های سلولی بالا که باعث کاهش pH می‌شود. یک بافر ممکن است برای ثابت نگه داشتن pH در محیط کشت وارد شود اما در CO_2 خارجی ممکن است هنوز برای برخی از رده‌های سلولی بخصوص در غلظت‌های سلولی پایین، برای جلوگیری از فقدان کامل CO_2 و بیکربنات حل شده در محیط کشت، مورد نیاز باشد. علیرغم ظرفیت بافری ناچیز در pH فیزیولوژیکی، بافر بیکربنات به دلیل سمیت پایین،هزینه اندک و فواید غذایی برای کشت، هنوز بیشتر از بافرهای دیگر استفاده می‌شود. HEPES یک بافر قوی‌تر در محدوده‌ی ۷/۶-۷/۲ pH بوده و اکنون اغلب در غلظت ۱۰ یا ۲۰mM استفاده می‌شود. مشخص شده است که وقتی HEPES به همراه CO_2 خارجی استفاده می‌شود، برای ایجاد خاصیت بافری مناسب، غلظت HEPES باید بیش از دو برابر مقدار بیکربنات باشد. یک تغییر در Ham's F12 با HEPES ۲۰ mM، ۱۰mM بی‌کربنات و ٪۲ CO_2 برای کشت تعدادی از رده‌های سلولی مختلف به طور موفقیت‌آمیز استفاده شده است. این کار دستکاری پلیت‌های میکروتیتراسیون و پلیت‌های چاهک‌دار دیگر را در خارج از انکوباتور بدون این که افزایش زیاد در pH حاصل شود، امکان‌پذیر ساخته و نیاز برای HEPES که هم گران و هم سمی می‌باشد را به حداقل می‌رساند.

اکسیژن

یکی دیگر از اجزاء اصلی تشکیل دهنده فاز گازی، اکسیژن می‌باشد. در حالی که اغلب سلول‌ها برای تنفس در *in vitro* به اکسیژن نیاز دارند، اغلب سلول‌های کشت شده وابسته به گلیکولیز بوده، یک نسبت بالایی از آنها، همانند سلول‌های ترانسفورم شده ممکن است بیهوازی باشند. هر چند با مقایسه با هموگلوبین خون تلاش‌هایی برای وارد کردن حامل‌های O_2 صورت گرفته است. تا به حال این کار مورد استفاده عمومی قرار نگرفته و سلول‌ها به طور عمده وابسته به O_2 حل شده می‌باشند که می‌تواند به دلیل افزایش سطح رادیکال‌های آزاد، سمی باشد. بنابراین فراهم کردن فشار O_2 صحیح، همیشه یک سازش بین برآوردن نیازهای تنفسی و جلوگیری از سمیت می‌باشد. راهکارهایی برای سطح بالا و پایین O_2 همانند وارد کردن گیرنده‌های رادیکال‌های آزاد از قبیل گلوتاتیون، ۲- مرکاپتواتانول (β- مرکاپتواتانول) یا دی تیوتریتول در محیط کشت به کار گرفته می‌شود. اغلب اینگونه راهکارها به صورت تجربی حاصل شده است.

نیاز به اکسیژن در کشت‌های مختلف، متفاوت بوده که فرق عمده بین کشت سلولی و کشت اندام می‌باشد. در حالی که فشارهای اتمسفری یا پایین‌تر اکسیژن برای اغلب کشت‌های سلولی ترجیح داده می‌شود، بعضی از کشت‌های اندام، مخصوصاً از جنین‌های مرحله تاخیری (late-stage embryoes) نوزادان یا افراد بالغ تا ٪۹۵ O_2 در فاز گازی نیاز دارند. این نیاز برای سطح بالای O_2 ممکن است به دلیل مشکل انتشار به دلیل هندسه و نفوذ گازی کشت‌های اندام باشد، اما ممکن است همچنین تفاوت میان سلول‌های تمایز یافته و سلول‌هایی که سریعاً در حال تکثیر می‌باشند را منعکس کند. همچنین ممکن است انتشار اکسیژن در ریزحامل‌های متخلخل محدود کننده باشد.

جدول ۱-۶: رابطه بین بی کربنات، دی اکسید کربن و HEPES

Compound	Eagle's MEM Hanks's salts	Low HCO_3^- + buffer	Eagle's MEM Earle's salts	DMEM
$NaHCO_3$	4 mM	10 mM	26 mM	44 mM
CO_2	Atmospheric and evolved from culture	2%	5%	10%
HEPES* (if required)	10 mM	20 mM	50 mM	—

*If HEPES is used, the equivalent molarity of NaCl must be omitted and osmolality must be checked.

اکثر کشت‌های سلولی پراکنده، غلظت پایین اکسیژن را ترجیح می‌دهند و بعضی سیستم‌ها (مثل سلول‌های توموری انسان در سنجش کلونوژنیک و فیبروبلاست‌های ریه جنین انسان) در فشار اکسیژن پایین‌تر از سطح نرمال اتمسفری، بهتر رشد می‌کنند. McKeehan و همکارانش پیشنهاد کرده‌اند که نیاز به سلنیوم در محیط کشت، وابسته به سمیت اکسیژن می‌باشد، چون سلنیوم یک کوفاکتور در سنتز گلوتاتیون می‌باشد. تحمل اکسیژن و همچنین سلنیوم ممکن است توسط سرم فراهم شود، بنابراین احتمالاً کنترل فشار O_2 در محیط‌های کشت فاقد سرم حیاتی‌تر می‌باشد. چون عمق محیط کشت می‌تواند بر روی انتشار اکسیژن به سلول‌ها موثر باشد، بهتر است که عمق محیط کشت در محدوده ۲-۵mm (۰/۲-۰/۵ mL/cm^2) در کشت ایستا نگهداری شود.

اسمولالیته

اکثر سلول‌های کشت یافته، تحمل نسبتاً زیادی نسبت به فشار اسمزی دارند. چون اسمولالیته پلاسما انسان در حدود ۲۹۰mosmol/kg می‌باشد، عاقلانه است که فرض کنیم که این سطح برای سلول‌های انسان در *in vivo* بهینه می‌باشد هر چند ممکن است برای گونه‌های دیگر متفاوت باشد (مثلاً حدود۳۱۰ mosmol/kg برای موش‌ها). در عمل برای اغلب سلول‌ها اسمولالیته بین ۲۶۰-۳۲۰ mosmol/kg کاملاً قابل قبول بوده اما وقتی انتخاب شد باید در ±۱۰ mosmol/kg ثابت نگهداشته شود. ممکن است محیط کشت کمی هیپوتونیک برای کشت پتری‌دیش یا پلیت در باز بهتر باشد تا در طی انکوباسیون تبخیر جبران شود.

معمولاً اسمولالیتی با کاهش نقطه انجماد یا افزایش فشار بخار محیط کشت اندازه‌گیری می‌شود. اگر شما خودتان محیط کشت را می‌سازید اندازه‌گیری اسمولالیتی یک مرحله کنترل کیفی مفید می‌باشد چون به جلوگیری از بروز اشتباه در وزن کردن، رقیق سازی و غیره کمک می‌کند. مخصوصاً اگر تغییراتی در اجزای تشکیل دهنده محیط کشت ایجاد شود، لازم است که اسمولالیتی اندازه‌گیری شود. افزودن HEPES و داروهای حل شده در اسیدها و بازهای قوی و خنثی سازی بعدی آنها، همگی می‌تواند بر روی اسمولالیتی موثر باشد.

درجه حرارت

درجه حرارت بهینه برای کشت سلولی وابسته به:

۱) درجه حرارت بدن حیوانی که سلول‌ها از آن به دست آمده

۲) هرگونه تغیر آناتومیکی در درجه حرارت (مثلاً ممکن است درجه حرارت پوست و بیضه کمتر از بقیه بدن باشد) و

۳) مشارکت یک عامل اطمینان تا امکان خطاهای کوچک در تنظیم کردن انکوباتور فراهم باشد.

بنابراین درجه حرارت توصیه شده برای اغلب رده‌های سلولی انسانی و حیوانات خونگرم ۳۷°C، نزدیک به درجه حرارت بدن می‌باشد اما برای اطمینان کمی پایین‌تر تنظیم می‌شود چون افزایش دما مشکلات جدی‌تری را نسبت به حرارت کمتر ایجاد می‌کند.

به دلیل حرارت بالاتر بدن پرندگان، باید سلول‌های ماکیان برای حداکثر رشد در ۳۸/۵°C نگهداری شوند، اما در دمای ۳۷°C هر چند رشد آهسته‌تر است اما کاملاً رضایت‌بخش می باشد.

سلول‌های کشت شده تغییرات زیادی را در درجه حرارت تحمل می‌کنند. آنها قادرند چندین روز در حرارت ۴°C زنده مانده و می‌توانند تا درجه حرارت ۱۹۶°C- سرد و منجمد شوند اما آنها نمی‌توانند حرارت بیش از ۲°C بالای حد معمول (۳۹/۵°C) را برای بیش از چند ساعت تحمل کنند و در دمای ۴۰°C و بالاتر سریعاً خواهند مرد؛ به منظور دستیابی به نتایج تجدیدپذیر باید توجه خاصی به ثابت ماندن درجه حرارت (به اندازه ±۰/۵°C) صورت پذیرد. درهای انکوباتورها یا گرم خانه‌ها نباید بیش از حد مورد نیاز باز مانده و چیزهای بزرگ یا مایعاتی که در گرمخانه گذاشته می‌شوند تا گرم شوند نباید نزدیک کشت‌ها قرار داده شوند. همچنین توزیع درجه حرارت در داخل انکوباتور یا گرمخانه باید یکنواخت باشد؛ نباید هیچگونه «نقاط سردی» (cold spots) وجود داشته و باید هوا

آزادانه جریان یابد. این به این معنی است که نباید تعداد زیادی فلاسک روی هم چیده شوند و باید بین آنها فاصله وجود داشته باشد تا هوا جریان یابد.

علاوه بر تاثیر مستقیم درجه حرارت بر روی رشد سلولی، همچنین درجه حرارت به دلیل افزایش حلالیت CO_2 در درجه حرارت‌های پایین‌تر و احتمالاً به دلیل تغییرات در یونیزاسیون و pKa بافر باعث تأثیر بر روی pH خواهد شد. pH باید در درجه حرارت اتاق نسبت به درجه حرارت ۳۷°C تا ۰/۲ واحد کمتر تنظیم شود. برای تهیه یک کشت برای اولین بار بهترین کار این است که محیط کشت را ساخته و با سرم کامل کرده (در صورت استفاده از سرم) و نمونه را در درجه حرارت ۳۷°C به مدت یک شب تحت فشار گازی صحیح، به منظور بررسی pH انکوبه کنید.

ویسکوزیته

ویسکوزیته یک محیط کشت به طور عمده تحت تأثیر مقدار سرم قرار گرفته و در اغلب موارد تأثیر کمی بر روی رشد سلولی دارد. هر چند وقتی که یک سوسپانسیون سلول همزنی می‌شود یا زمانی که سلول‌ها بعد از تریپسینه کردن جدا می‌شوند، ویسکوزیته مهم می‌شود. هرگونه آسیب سلولی که ممکن است تحت این شرایط رخ دهد را ممکن است با افزایش ویسکوزیته محیط کشت با کربوکسی متیل سلولز (CMC) یا پلی وینیل پیرولیدین (PVP) کاهش داد. این کار بخصوص در غلظت‌های پایین سرم، در غیاب سرم و در کشت‌های بیوراکتور همزن‌دار که در آنها اغلب Pluronic F68 استفاده می‌شود، مهم می‌باشد، هر چند تأثیر آن احتمالاً پلئوتروپیک (Pleiotropic) می‌باشد.

فشار سطحی و تولید کف

تأثیرات کف به طور آشکار مشخص نشده اما ممکن است میزان دناتوراسیون پروتئین را افزایش دهد و همچنین ممکن است اگر کف به گردنه ظروف کشت برسد خطر آلودگی وجود داشته باشد. همچنین کف کردن اگر باعث ایجاد یک لایه کف در فضای موئین بین درپوش و بطری و یا بین درپوش و پایه پتری دیش شود، انتشار گازی را محدود خواهد ساخت.

وقتی که هوای حاوی ۵٪ CO_2 به محیط کشت دارای سرم در کشت‌های سوسپانسیون دمیده می‌شود، می‌تواند کف تولید شود. افزودن یک ضد کف سیلیکون یا Pluronic F68 به میزان ۰/۱٪ – ۰/۰۱ با کاهش دادن کشش سطحی از ایجاد کف در این شرایط جلوگیری کرده و همچنین ممکن است سلول‌ها را در برابر فشار برشی (shear stress) حباب‌ها محافظت کند.

محلول‌های نمکی متعادل

یک محلول نمکی متعادل (Balanced Salt Solution: BSS) از نمک‌های غیرآلی تشکیل شده و ممکن است شامل بی‌کربنات سدیم و در بعضی موارد گلوکز باشد. ترکیبات بعضی از محلول‌های نمکی متعادل متداول در جدول ۲-۶ آورده شده است. در صورت نیاز ممکن است به اینگونه محلول‌ها، بافر HEPES (۵-۲۰mM) افزوده شده و وزن معادل با آن از NaCl حذف شده تا اسمولاریتی صحیح حفظ شود. BSS اساس بسیاری از محیط‌های کشت کامل را تشکیل داده و در کاتالوگ‌ها اغلب نوع BSS ذکر می‌شود مثلاً Eagle's MEM با نمک‌های Hank یا Eagle's MEM با نمک‌های Earle که نشان دهنده این است که کدام فرمولاسیون BSS استفاده شده است. نمک‌های Hank لزوم استفاده از فلاسک‌های دربسته با یک فاز گازی از هوا را ایجاب کرده در حالی که نمک‌های Earle یک غلظت بالاتری از بی‌کربنات سازگار با رشد در CO_2 ۵٪ را ایجاب می‌کند.

همچنین BSS به عنوان یک رقیق کننده برای محلول‌های غلیظ اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها برای ساخت محیط‌های کشت کامل، به عنوان محیط کشت یا تشریح و برای انکوباسیون‌های کوتاه تا حدود ۴ ساعت (معمولاً با گلوکز) استفاده می‌شود. اغلب این دستورالعمل‌ها به عنوان مثال با حذف گلوکز یا فنل رد از Hank's BSS یا با حذف یون‌های Ca^{2+} یا Mg^{2+} از Dulbecco's PBS تغییر می‌یابند. BPS بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} به عنوان محلول A، PBS شناخته می‌شود و در کل این کتاب D-PBSA برای نشان دادن عدم حضور این کاتیون‌های دوظرفیتی استفاده خواهد شد. باید همیشه در موقع خریداری BSS، تغییرات بررسی شده و هرگونه تغییر در فرمول باید در گزارشات ذکر شود.

انتخاب BSS به هم فشار CO_2 و هم مصرف محلول مورد استفاده برای جداسازی بافت یا پراکنده کردن تک لایه وابسته می‌باشد. در این موارد همانند محلول نمکی بدون کلسیم و منیزیم Moscona یا D-PBSA معمولاً Ca^{2+} و Mg^{2+} حذف می‌شوند. همچنین انتخاب BSS وابسته به این می‌باشد که آیا محلول برای کشت سوسپانسیون یا سلول‌ها چسبیده استفاده می‌شود. S-MEM، بر پایه محلول نمکی Eagle's Spinner یک نوع دیگر از MEM می‌باشد که به منظور کاهش تجمع سلولی و اتصال، فاقد Ca^{2+} می‌باشد.

محیط‌های کشت کامل

محیط‌های کشت کامل از نظر پیچیدگی از Eagle's MEM نسبتاً ساده که حاوی ویتامین‌ها، نمک‌ها و اسیدهای آمینه ضروری بوده تا محیط‌های کشت پیچیده از قبیل محیط کشت 199(M199)، CMRL 1066،

جدول ۲-۶: محلولهای نمکی متعادل

Component		Earle's BSS		Dulbecco's PBS: Without Ca^{2+} and Mg^{2+} (D-PBSA)		Dulbecco's PBS: With Ca^{2+} and Mg^{2+}		Hanks's BSS		Spinner salts (as in S-MEM)	
	M.W.	g/L	mM	g/L	mM	g/L	mM	g/L	mM	g/L	mM
Inorganic salts											
$CaCl_2$ (anhydrous)	111	0.02	0.18			0.2	1.80	0.14	1.3		
KCl	74.55	0.4	5.37	0.2	2.68	0.2	2.68	0.4	5.4	0.40	5.37
KH_2PO_4	136.1			0.2	1.47	0.2	1.47	0.06	0.4		
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203.3							0.1	0.5		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.5	0.2	0.81			0.98	3.98	0.1	0.4	0.20	0.81
NaCl	58.44	6.68	114.3	8	136.9	8	136.9	8	136.9	6.80	116.4
$NaHCO_3$	84.01	2.2	26.19					0.35	4.2	2.20	26.19
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	268.1			2.2	8.06	2.16	8.06	0.09	0.3		
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	138	0.14	1.01							1.40	10.14
Total salt			147.9		149.1		154.00		149.4		158.9
Other components											
D-glucose	180.2	1	5.55					1	5.5	1.00	5.55
Phenol red	354.4	0.01	0.03					0.01	0.0	0.01	0.03
Gas phase		5% CO_2				Air		Air		5% CO_2	

MB 752/1، RPMI 1640 و F12 و محـدوده وسـیعی از فرمولاسیون‌های فاقد سرم متفاوت می‌باشند. محیط‌هـای کـشت پیچیده دارای مقادیر بیشتری از اسیدهای آمینه مختلـف، شـامل اسیدهای آمینه غیرضروری و ویتامین‌های اضافی بوده و اغلـب با متابولیت‌های اضافی (مثل نوکلئوزیدها، واسـطه‌هـای چرخـه تـری‌کربوکـسیلیک اسـید و لیپیـدها) و مـواد معـدنی تکمیـل می‌شوند. به طور کلی غلظت‌های مـواد غـذایی در F12 پـایین بوده (که برای کلونینگ بهینه شده است) و در DMEM که در دانسیته‌های سلولی بالاتر برای تکثیر ویروسی بهینه شده اسـت، بالا می‌باشد. Barnes و Sato یـک مخلـوطی از DMEM و F12 را به نسبت ۱:۱ به عنوان مبنا برای فرمولاسیون‌های بدون سرم خودشان به کار بردند تا فراوانی مواد F12 و غلظت بالاتر مواد غذایی DMEM را ترکیب کنند. این ترکیب یـک فرمـول تجربی را فراهم ساخته که به عنوان یک محیط کـشت پایـه، بـا تکمیل کردن بـا افزودنـی‌هـای خـاص بـرای بـسیاری از انـواع سلول‌های مختلف مناسب می‌باشد.

اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه ضروری (یعنی آنهایی که در بدن ساخته نمی‌شوند) و همچنین سیستئین و تیروزین برای سلول‌های کشت داده شده مورد نیاز می‌باشند، هر چند احتیاجات اختصاصی اسیدهای آمینه از یک سلول به سلول دیگر متفاوت می‌باشد. همچنین اغلب اسیدهای آمینه غیرضروری دیگر افزوده شده تا ناتوانی نوع سلولی خاصی را در ساختن آنها جبران کرده و یا چون آنها ساخته می‌شوند اما با تراوش در محیط کشت از دست می‌روند. غلظت اسیدهای آمینه معمولاً حداکثر غلظت سلولی قابل حصول را محدود کرده و ممکن است بر روی زیستایی سلول و میزان رشد تأثیر گذارد. گلوتامین برای اکثر سلول‌ها مورد نیاز می‌باشد، هر چند برخی از رده‌های سلولی از گلوتامات استفاده می‌کنند. همچنین شواهد نشان می‌دهد که گلوتامین در سلول‌های کشت شده به عنوان یک منبع انرژی و کربن استفاده می‌شود.

ویتامین‌ها

Eagle's MEM فقط حاوی ویتامین‌های محلول در آب می‌باشد (گروه B، به اضافه کولین، اسید فولیک، اینوزیتول و نیکوتین آمید) اما فاقد بیوتین می‌باشد(جدول ۳-۶). احتمالاً نیازهای دیگر از سرم تامین می‌شود. بیوتین در اغلب محیط‌های کشت پیچیده‌تر به انضمام محیط‌های کشت بدون سرم وجود داشته و پارا آمینو بنزوئیک اسید (PABA) در M199، CMRL 1066 (که از M199 منشاء گرفته است) و RPMI 1640 وجود دارد. همه ویتامین‌های محلول در چربی (K,E,D,A) فقط در M199 وجود دارند، در حالی که ویتامین A در LHC-9 و ویتامین E در MCDB 110 وجود

دارد (جدول ۱–۷). غلظت بعضی از ویتامین‌ها (مثل کولین و نیکوتین آمید) در محیط‌های کشت بدون سرم افزایش یافته است. محدودیت ویتامین ـ به عنوان مثال با رسوب فولات از محلول استوک غلیظ ـ معمولاً دارارتباط با بقاء سلولی و میزان رشد کاهش یافته به جای دانسیته سلولی حداکثر بیان می‌شود. همانند اسیدهای آمینه، نیاز به ویتامین‌ها به صورت تجربی به دست آمده است و مربوط به رده سلولی که در ابتدا در تکامل آنها استفاده شده می‌باشد. به عنوان مثال محیط کشت Fischer دارای غلظت بالایی از فولات می‌باشد زیرا L5178Y که در تکامل محیط کشت استفاده شد وابسته به فولات می‌باشد.

نمک‌ها

نمک ها عمدتاً شامل Na^+، K^+، Mg^{2+}، Ca^{2+}، Cl^-، SO_4^{2-}، PO_4^{2-}، PO_4^{3-} و HCO_3^- می‌باشند و اجزای اصلی شرکت کننده در اسمولالیته محیط کشت می‌باشند. بیشتر محیط‌های کشت غلظت‌های نمکی خود را در ابتدا از Earle's BSS (بی‌کربنات زیاد، فاز گازی ٪۵ CO_2) یا Hank's BSS (بی‌کربنات کم، فاز گازی هوا) گرفتند. کاتیون‌های دو ظرفیتی، مخصوصاً Ca^{2+} برای برخی از ملکول‌های اتصال سلولی از قبیل کدهرین‌ها مورد نیاز می‌باشد. همچنین Ca^{2+} به عنوان یک واسطه در انتقال سیگنال (signal transduction) عمل کرده و غلظت Ca^{2+} در محیط کشت می‌تواند این که آیا سلول‌ها تکثیر شده یا تمایز یابند را تحت تأثیر قرار دهد. Na^{2+}، K^+ و Cl^- پتانسیل غشاء را تنظیم کرده در حالی که SO_4^{2-}، PO_4^{3-} و HCO_3^- به عنوان آنیون‌های مورد نیاز برای ماتریکس و پیش‌سازهای مغذی (nutritional precursor) برای ماکروملکول‌ها و همچنین تنظیم کننده‌های بار داخل سلولی ایفای نقش می‌کنند.

کلسیم در کشت‌های سوسپانسیون به منظور به حداقل رساندن تجمع سلولی و اتصال، کاهش می‌یابد. غلظت بیکربنات سدیم توسط CO_2 در فاز گازی تعیین شده و علاوه بر قابلیت بافری یک نقش مهم غذایی نیز دارد.

گلوکز

گلوکز در اغلب محیط‌های کشت به عنوان یک منبع انرژی وجود دارد. گلوکز بیشتر توسط گلیکولیز متابولیزه شده تا پیروات تشکیل شود، که ممکن است به لاکتات یا استولاکتات تبدیل شده و ممکن است وارد چرخه اسید سیتریک شده تا CO_2 تشکیل شود. تجمع اسیدلاکتیک در محیط کشت، مخصوصاً در سلول‌های جنینی و ترانسفورم شده دلالت بر این دارد که ممکن است چرخه اسید سیتریک کاملاً مشابه *in vivo* کار نکند و اطلاعات اخیر نشان می دهد که بیشتر کربن آن به جای گلوکز از گلوتامین منشاء گرفته است. این یافته‌ها ممکن است دلیل نیاز بالای بعضی از سلول‌های کشت داده شده نسبت به گلوتامین یا گلوتامات را مشخص کند.

مکمل‌های آلی

انواعی از ترکیبات دیگر، شامل پروتئین‌ها، پپتیدها، نوکلئوزیدها، واسطه‌های چرخه اسید سیتریک، پیروات و لیپیدها در محیط‌های کشت پیچیده وجود دارند. مشخص شده است که وقتی غلظت سرم کاهش می‌یابد، به این ترکیبات نیاز بوده و آنها ممکن است در کلونینگ و در نگهداری سلول‌های اختصاصی مشخص حتی در حضور سرم کمک کنند.

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد

هورمون‌ها و فاکتورهای رشد در فرمول بسیاری از محیط‌های کشت عادی وجود ندارد هر چند آنها اغلب به محیط‌های کشت فاقد سرم اضافه می‌شوند.

آنتی بیوتیک‌ها

آنتی بیوتیک‌ها در ابتدا برای کاهش وقوع آلودگی در محیط های کشت مرسوم شد. هر چند استفاده از هودهای لامینارفلو، به همراه تکنیک‌های سترون، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را غیرضروری کرده است. در واقع آنتی‌بیوتیک‌ها دارای چندین عیب عمده می‌باشند:

۱) ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را افزایش می‌دهند.

۲) حضور آلوده کننده‌های نهانی در سطح کم را مخفی نگه می‌دارند که در صورتی که آنتی‌بیوتیک‌ها برداشته شوند، شرایط کشت تغییر یابد یا سویه‌های مقاوم ایجاد شوند، کاملاً فعال می‌شوند.

۳) عفونت‌های میکوپلاسمایی را مخفی نگه می‌دارند.

۴) دارای تاثیرات آنتی متابولیک بوده که می‌تواند با سلول‌های پستانداران به صورت متقاطع واکنش دهد.

۵) تکنیک‌های ضعیف سترون را ترغیب می‌کند.

به تمام دلایل ذکر شده قویاً توصیه می‌شود که کشت روتین در غیاب آنتی‌بیوتیک‌ها انجام شده و استفاده از آنها محدود به

جدول ۳-۶: محیط های کشت پرمصرف

Component	MEM	DMEM	F12	DMEM/ F12	αMEM	CMRL 1066	RPMI 1640	M199	L15	McCoy's 5A	Fischer	MB 752/1
Amino acids												
L-alanine			1.0E-04	5.0E-05	2.8E-04	2.8E-04		2.8E-04	2.5E-03	1.5E-04		
L-arginine	6.0E-04	4.0E-04	1.0E-03	7.0E-04	6.0E-04	3.3E-04	1.1E-03	3.3E-04	2.9E-03	2.0E-04	7.1E-05	3.6E-04
L-asparagine			1.0E-04	5.0E-05	3.3E-04	3.8E-04	1.7E-03	3.0E-04	7.6E-05			
L-aspartic acid			1.0E-04	5.0E-05	2.3E-04	2.3E-04	1.5E-04	2.3E-04		1.5E-04		4.5E-04
L-cysteine			2.0E-04	1.0E-04	5.7E-04	1.5E-03		5.6E-07	9.9E-04	2.0E-04		5.0E-04
L-cystine	1.0E-04	2.0E-04		1.0E-04	1.0E-04	8.3E-05	2.1E-04	9.9E-05			9.9E-05	6.3E-05
L-glutamic acid			1.0E-04	5.0E-05	5.1E-04	5.1E-04	1.4E-04	4.5E-04		1.5E-04		1.0E-03
L-glutamine	2.0E-03	4.0E-03	1.0E-03	2.5E-03	2.0E-03	6.8E-04	2.1E-03	6.8E-04	2.1E-03	1.5E-03	1.4E-03	2.4E-03
Glycine		4.0E-04	1.0E-04	2.5E-04	6.7E-04	6.7E-04	1.3E-04	6.7E-04	2.7E-03	1.0E-04		6.7E-04
L-histidine	2.0E-04	2.0E-04	1.0E-04	1.5E-04	2.0E-04	9.5E-05	9.7E-05	1.0E-04	1.6E-03	1.0E-04	3.9E-04	8.3E-04
L-hydroxy-proline						7.6E-05	1.5E-04	7.6E-05		1.5E-04		
L-isoleucine	4.0E-04	8.0E-04	3.0E-05	4.2E-04	4.0E-04	1.5E-04	3.8E-04	1.5E-04	9.5E-04	3.0E-04	5.7E-04	1.9E-04
L-leucine	4.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	4.5E-04	4.0E-04	4.6E-04	3.8E-04	4.6E-04	9.5E-04	3.0E-04	2.3E-04	3.8E-04
L-lysine HCl	4.0E-04	8.0E-04	2.0E-04	5.0E-04	4.0E-04	3.8E-04	2.2E-04	3.8E-04	5.1E-04	2.0E-04	2.7E-04	1.3E-03
L-methionine	1.0E-04	2.0E-04	3.0E-05	1.2E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	5.0E-04	1.0E-04	6.7E-04	3.4E-04
L-phenylalanine	2.0E-04	4.0E-04	3.0E-05	2.2E-04	1.9E-04	1.5E-04	9.1E-05	1.5E-04	7.6E-04	1.0E-04	4.1E-04	3.0E-04
L-proline			3.0E-04	1.5E-04	3.5E-04	3.5E-04	1.7E-04	3.5E-04		1.5E-04		4.3E-04
L-serine		4.0E-04	1.0E-04	2.5E-04	2.4E-04	2.4E-04	2.9E-04	2.4E-04	1.9E-03	2.5E-04	1.4E-04	
L-threonine	4.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	4.5E-04	4.0E-04	2.5E-04	1.7E-04	2.5E-04	2.5E-03	1.5E-04	3.4E-04	6.3E-04
L-tryptophan	4.9E-05	7.8E-05	1.0E-05	4.4E-05	4.9E-05	4.9E-05	2.5E-05	4.9E-05	9.8E-05	1.5E-05	4.9E-05	2.0E-04
L-tyrosine	2.0E-04	4.0E-04	3.0E-05	2.1E-04	2.3E-04	2.2E-04	1.1E-04	2.2E-04	1.7E-03	1.2E-04	3.3E-04	2.2E-04
L-valine	4.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	4.5E-04	3.9E-04	2.1E-04	1.7E-04	2.1E-04	8.5E-04	1.5E-04	6.0E-04	5.6E-04
Vitamins												
p-Aminobenzoic acid						3.6E-07	7.3E-06	3.6E-07		7.3E-06		
L-Ascorbic acid					2.5E-04	2.8E-04		2.8E-07		3.2E-06		9.9E-05
Biotin			3.0E-08	1.5E-08	4.1E-07	4.1E-08	8.2E-07	4.1E-08		8.2E-07	4.1E-08	8.2E-08
Calciferol								2.5E-07				
Choline chloride	7.1E-06	2.9E-05	1.0E-04	6.4E-05	7.1E-06	3.6E-06	2.1E-05	3.6E-06	7.1E-06	3.6E-05	1.1E-05	1.8E-03
Folic acid	2.3E-06	9.1E-06	2.9E-06	6.0E-06	2.3E-06	2.3E-08	2.3E-06	2.3E-08	2.3E-06	2.3E-05	2.3E-05	9.1E-07
myo-Inositol	1.1E-05	4.0E-05	1.0E-04	7.0E-05	1.1E-05	2.8E-07	1.9E-04	2.8E-07	1.1E-05	2.0E-04	8.3E-06	5.6E-06
Menadione								6.9E-08				
Nicotinamide	8.2E-06	3.3E-05	3.3E-07	1.7E-05	8.2E-06	2.0E-07	8.2E-06	2.0E-07	8.2E-06	4.1E-06	4.1E-06	8.2E-06
Nicotinic acid								2.0E-07		4.1E-06		
D-Ca pantothenate	4.2E-06	1.7E-05	2.0E-06	9.4E-06	4.2E-06	4.2E-08	1.1E-06	4.2E-08	4.2E-06	8.4E-07	2.1E-06	4.2E-06
Pyridoxal HCl	4.9E-06	2.0E-05	3.0E-07	1.0E-05	4.9E-06	1.2E-07		1.2E-07		2.5E-06	2.5E-06	
Pyridoxine HCl			3.0E-07	1.5E-07		1.2E-07	4.9E-06	1.2E-07		2.4E-06		4.9E-06
Riboflavin	2.7E-07	1.1E-06	1.0E-07	5.8E-07	2.7E-07	2.7E-08	5.3E-07	2.7E-08	1.9E-07	5.3E-07	1.3E-06	2.7E-06
Thiamin	3.0E-06	1.2E-05	1.0E-06	6.4E-06	3.0E-06	3.0E-08	3.0E-06	3.0E-08	2.4E-06	5.9E-07	3.0E-06	3.0E-05
Thiamin mono PO_4										4.8E-06		
α-Tocopherol								2.3E-08				
Retinol acetate								3.5E-07				
Vitamin B_{12}			1.0E-06	5.0E-07	1.0E-06		3.7E-09					1.5E-07
Antioxidants												
Glutathione						3.0E-05	3.0E-06	1.5E-07		1.5E-06		4.5E-05
Inorganic salts												
$CaCl_2$	1.8E-03	1.8E-03	3.0E-04	1.1E-03	1.8E-03	1.8E-03		1.3E-03	1.3E-03	9.0E-04	6.2E-04	8.2E-04
KCl	5.3E-03	5.3E-03	3.0E-03	4.2E-03	5.3E-04	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	5.3E-03	2.0E-03
KH_2PO_4								4.4E-04	4.4E-04			5.9E-04
$MgCl_2$					1.2E-01							1.2E-03
$MgSO_4$	8.1E-04	8.1E-04		4.0E-04	8.1E-04	8.1E-04	4.0E-04	8.1E-04	1.6E-03	8.1E-04	4.9E-04	8.1E-04
NaCl	1.2E-01	1.1E-01	1.3E-01	1.2E-01		1.2E-01	1.0E-01	1.4E-01	1.4E-01	1.1E-01	1.4E-01	1.0E-01
$NaHCO_3$	2.6E-02	4.4E-02	1.4E-02	2.9E-02	2.6E-02	2.6E-02	4.2E-03		2.6E-02	1.3E-02	2.7E-02	
NaH_2PO_4	1.0E-03	9.1E-04		4.5E-04		1.0E-03				4.2E-03	5.7E-04	
Na_2HPO_4			1.0E-03	5.0E-04			5.6E-03	4.0E-04	1.6E-03		5.0E-04	2.1E-03

جدول ۳-۶: محیط های کشت پرمصرف(ادامه)

Component	MEM	DMEM	F12	DMEM/ F12	αMEM	CMRL 1066	RPMI 1640	M199	L15	McCoy's 5A	Fischer	MB 752/1
Trace elements												
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$			1.6E-08	7.8E-09								
$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$		2.5E-07		1.2E-07								
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$			3.0E-06	1.5E-06								
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$			3.0E-06	1.5E-06								
Bases, nucleosides, etc.												
Adenine SO_4								5.4E-05				
Adenosine					3.7E-05							
AMP								5.8E-07				
ATP								1.8E-05				
Cytidine					4.1E-05							
Deoxyadenosine					4.0E-05	4.0E-05						
Deoxycytidine					4.2E-05	3.8E-05						
Deoxyguanosine					3.7E-05	3.7E-05						
2-Deoxyribose								3.7E-06				
DPN						9.5E-06						
FAD						1.2E-06						
Glucuronate, Na						1.9E-05						
Guanine								1.6E-06				
Guanosine					3.5E-05							
Hypoxanthine			3.0E-05	1.5E-05				2.2E-06				
5-Me-deoxycytidine						4.1E-07						
D-Ribose								3.3E-06				
Thymidine			3.0E-06	1.5E-06	4.1E-05	4.1E-05						
Thymine								2.4E-06				
TPN						1.3E-06						
Uracil								2.7E-06				
Uridine					4.1E-05							
UTP						1.8E-06						
Xanthine								2.0E-06				
Energy metabolism												
Cocarboxylase						2.2E-06						
Coenzyme A						3.3E-06						
D-galactose									5.0E-02			
D-glucose	5.6E-03	2.5E-02	1.0E-02	1.8E-02	5.6E-03	5.6E-03	1.1E-02	5.6E-03		1.7E-02	5.6E-03	2.8E-02
Sodium acetate						6.1E-04		4.5E-04				
Sodium pyruvate		1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03				5.0E-03			
Lipids and precursors												
Cholesterol						5.2E-07		5.2E-07				
Ethanol (solvent)						3.5E-04						
Linoleic acid		3.0E-07		1.5E-07								8.9E-05
Lipoic acid			1.0E-06	5.1E-07	9.7E-07							
Tween 80						1.8E-05		1.8E-05				
Other components												
Peptone, mg/mL										0.6		
Phenol red	2.7E-05	4.0E-05	3.2E-05	3.6E-05	2.9E-05	5.3E-05	1.3E-05	4.5E-05	2.7E-05	2.9E-05	1.3E-05	2.7E-05
Putrescine			1.0E-06	5.0E-07								
Gas phase												
CO_2	5%	10%	2%	7%	5%	5%	5%	5%	Air	5%	2%	5%

All concentrations are molar, and computer-style notation is used (e.g., 3.0E-2 = 3.0×10^{-2} = 30 mM). Molecular weights are given for root compounds; although some recipes use salts or hydrated forms, molarities will, of course, remain the same. *Synonyms and abbreviations:* AMP, adenosine monophosphate; ATP, adenosine triphosphate; biotin = vitamin H; calciferol = vitamin D_2; FAD, flavine adenine dinucleotide; lipoic acid = thioctic acid; menadione = vitamin K_3; *myo*-inositol; = L-inostitol; nicotinamide = niacinamide; nicotinic acid = niacin; pyridoxine HCl = vitamin B_6; thiamin = vitamin B_1; α-tocopherol = vitamin E; retinol = vitamin A_1; TPN, triphosphopyridine nucleotide; UTP, uridine triphosphate; vitamin B_{12} = cobalamin. See text for references.

کشت اولیه یا آزمایشات در مقیاس بالا و پر زحمت و پر هزینه شود. اگر شرایط، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را ایجاب کند، باید به محض این که امکان‌پذیر بود آنتی‌بیوتیک‌ها را حذف کرده یا اگر آنها در مدت زمان طولانی استفاده می‌شوند، باید کشت‌های موازی بدون آنتی‌بیوتیک تهیه شود.

تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در کشت بافت در کنترل عفونت‌های باکتریایی موثر می باشند (جدول ۴-۶). هر چند تعداد زیادی از سویه های باکتریایی به صورت طبیعی یا انتخابی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌باشند، بنابراین کنترلی که آنها فراهم می‌سازند هرگز مطلق نمی‌باشد. کنترل

آلودگی‌های قارچی و مخمری با آنتی‌بیوتیک‌ها دارای دشواری خاصی می‌باشد که ممکن است آنها تحت کنترل بوده اما به ندرت رفع شوند.

سرم

سرم حاوی فاکتورهای رشد بوده که تکثیر سلولی را افزایش داده و فاکتورهای اتصال و فعالیت ضدتریپسین که اتصال سلولی را تسهیل می‌کنند. همچنین سرم یک منبع مواد معدنی، لیپیدها و هورمون‌ها بوده که بیشتر آنها ممکن است به پروتئین باند شوند. سرم‌هایی که بیشتر در کشت بافت استفاده می‌شوند شامل سرم گوساله، جنین گاو، اسب و انسان می‌باشد. سرم گوساله (CS) و سرم جنین گاو (FBS) مخصوصاً مورد دوم برای رده‌های سلولی سخت رشد و برای کلونینگ بیشترین استفاده را دارند. گاهی اوقات سرم انسان با بعضی از رده‌های سلولی انسانی استفاده می‌شود اما لازم است که نسبت به ویروس‌هایی مثل HIV و هپاتیت B غربالگری شود. بعضی افراد سرم اسب را نسبت به سرم گوساله ترجیح می‌دهند، چون آن را می‌توان از یک گله بسته (closed herd) به دست آورد و اغلب از بچی به بچ دیگر پایدارتر است. همچنین ممکن است سرم اسب به دلیل دارا بودن سطوح کمتری از پلی‌آمین اکسیداز به احتمال کمتری به پلی‌آمین‌ها متابولیزه شود. پلی آمین‌ها برای بعضی از سلول‌ها میتوژنیک می‌باشند.

پروتئین

هر چند پروتئین‌ها یک جزء اصلی سرم می‌باشند، وظیفه بسیاری از پروتئین‌ها در *in vivo* هنوز مبهم باقی مانده است. ممکن است که تعداد نسبتاً کمی پروتئین به جز حامل‌های موادمعدنی، اسیدهای چرب و هورمون‌ها مورد نیاز باشد. این پروتئین‌ها شامل آلبومین می‌باشد، که ممکن است به عنوان یک حامل لیپیدها یا مواد معدنی و گلوبولین‌ها مهم باشد، فیبرونکتین (گلوبولین نامحلول در سرما) که اتصال سلولی را تسهیل می‌کند و α-۲- ماکروگلوبولین که از فعالیت تریپسین جلوگیری می‌کند. فتوئین(fetuin) در سرم جنینی اتصال سلولی را افزایش داده و ترانسفرین به آهن متصل شده، سمیت آن را کاهش می‌دهد اما آن را در دسترس قرار می‌دهد. پروتئین‌های دیگر، که تا به حال شناخته نشده‌اند ممکن است برای اتصال سلولی و رشد ضروری باشند. همچنین پروتئین، ویسکوزیته محیط کشت را افزایش داده، فشار برشی (shear stress) در طی پی‌پت کردن و همزنی را کاهش داده و ممکن است ظرفیت بافری محیط کشت را افزایش دهد.

فاکتورهای رشد

لخته سرم طبیعی بیشتر از سرمی که سلول‌های آن به صورت فیزیکی (مثلاً با سانتریفوژ کردن) حذف شده‌اند تکثیر سلولی را تحریک می‌کند. به نظر می‌رسد این افزایش تحریک در نتیجه فاکتور رشد پلاکتی (platelet-derived growth factor: PDGF) باشد که در طی لخته شدن از پلاکت‌ها رها می‌شود. PDGF یکی از اعضای خانواده پلی پپتیدهای با فعالیت میتوژنیک بوده و احتمالاً فاکتور رشد اصلی در سرم می باشد. PDGF رشد فیبروبلاست‌ها و گلیا را تحریک می‌کند، اما فاکتورهای پلاکتی دیگر از قبیل TGF-β ممکن است در فاکتورهای رشد دیگر از قبیل فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs) فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتورهای رشد سلول اندوتلیال از قبیل فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و آنژیوژنین(angiogenin) و فاکتورهای رشد شبیه انسولین IGF-1 و IGF-2 که از بافت کامل جداسازی شده یا توسط سلول‌ها کشت داده شده در محیط کشت آزاد می‌شوند، دارای درجه‌های متفاوتی از اختصاصیت بوده و احتمالاً در سرم به مقدار کم وجود دارند. بسیاری از این فاکتورهای رشد به صورت تجاری به حالت پروتئین‌های نوترکیب موجود می‌باشند.

هورمون‌ها

انسولین جذب گلوکز و اسیدهای آمینه را افزایش داده و ممکن است اثر میتوژنیک آن به دلیل این خصوصیت یا فعالیت از طریق گیرنده IGF-1 باشد. IGF-1 و IGF-2 به گیرنده انسولین متصل می‌شوند اما همچنان گیرنده‌های اختصاصی خود را هم دارند که ممکن است انسولین با گرایش کمتری به آن متصل شود. همچنین IGF-2 جذب گلوکز را تحریک می‌کند. هورمون‌های رشد ممکن است در سرم مخصوصاً سرم جنینی وجود داشته و ممکن است با سوماتومدین‌ها (IGFs) یک اثر میتوژنیک داشته باشند. همچنین هیدروکورتیزون در سرم خصوصاً سرم جنین گاو در مقادیر مختلف وجود داشته و می‌تواند اتصال سلولی و تکثیر سلولی را تسهیل کند، اما تحت شرایط خاص (مثلاً دانسیته سلولی بالا) ممکن است سیتواستاتیک بوده و می‌تواند تمایز سلولی را القاء کند.

مواد مغذی و متابولیت‌ها

سرم همچنین ممکن است دارای اسیدهای آمینه، گلوکز، کتواسیدها، نوکلئوزیدها و تعداد دیگری از مواد مغذی و متابولیت‌های واسطه باشد. این امر ممکن است در محیط‌های کشت ساده مهم باشد اما در محیط های کشت پیچیده مخصوصاً آنهایی که دارای غلظت بالایی از اسیدهای آمینه و

مکمل‌های تعریف شده دیگر می‌باشند، از اهمیت کمتری برخوردار است.

لیپیدها

اسید لینولئیک، اسید اولئیک، اتانول آمین و فسفواتانول آمین در مقادیر کم در سرم معمولاً به صورت باند شده به پروتئین‌هایی از قبیل آلبومین وجود دارند.

مواد معدنی

آزمایشات جایگزینی سرم نشان داده که ممکن است عناصر کم مقدار و آهن، مس و روی به پروتئین سرم باند شوند. McKeehan و همکارانش نشان دادند که نیاز به سلنیوم احتمالاً به دلیل این است که به عنوان یک کوفاکتور برای GSH سنتتاز به غیرسمی شدن رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند.

بازدارنده‌ها

سرم ممکن است دارای موادی باشد که از تکثیر سلولی ممانعت می‌کنند. ممکن است تعدادی از آنها محصولات به وجود آمده در هنگام آماده‌سازی باشند (مثلاً سموم باکتریایی از آلودگی قبل از فیلتراسیون، یا آنتی‌بادی‌ها موجود در قسمت گاما ـ گلوبولین که با اپی‌توپهای سطحی بر روی سلولهای کشت داده شده واکنش متقاطع دارند)، اما ممکن است بقیه تنظیم کننده‌های رشد منفی فیزیولوژیکی از قبیل TGF-β باشند. غیرفعال سازی توسط حرارت کمپلمان را از سرم حذف کرده و فعالیت سیتوتوکسیک ایمنوگلوبولین را بدون این که به فاکتورهای رشد پلی‌پپتیدی آسیب برسد، کاهش می‌دهد، اما همچنین ممکن است بعضی از اجزاء سازنده ناپایدار هم از بین رفته و همیشه همانند سرم تیمار نشده رضایت‌بخش نمی‌باشد.

انتخاب محیط کشت و سرم

تمام ۱۲ محیط کشتی که در جدول ۳-۶ شرح داده شده است برای حمایت از رده‌های سلولی خاص تکامل یافته‌اند. بسیاری از این محیط های کشت برای سلول‌های L929 یا HeLa تکامل پیدا کرده‌اند و Ham’s F12 برای سلول‌های تخمدان هامستر چینی (CHO) طراحی شده است؛ مشخص شده است که RPMI 1640، DMEM و MEM معروف‌ترین محیط‌های کشت بوده و حدود ۷۵٪ از فروش شرکت‌های سازنده محیط کشت را تشکیل می‌دهند. فرمولاسیون‌های دیگر به ندرت بیش از ۵٪ از کل فروش را شامل می‌شوند.

جدول ۴-۶: آنتی بیوتیک های مورد استفاده در کشت بافت

Antibiotic	Concentration, µg/mL (unless otherwise stated)		Activity against
	Working	Cytotoxic	
Amphotericin B (Fungizone)	2.5	30	Fungi, yeasts
Ampicillin	2.5		Bacteria, gram positive and gram negative
Ciprofloxacin	100		Mycoplasma
Erythromycin	50	300	Mycoplasma
Gentamycin Gentamicin	50	>300	Bacteria, gram positive and gram negative; mycoplasma
Kanamycin	100	10 mg/mL	Bacteria, gram positive and gram negative; mycoplasma
MRA (ICN)	0.5		Mycoplasma
Neomycin	50	3,000	Bacteria, gram positive and gram negative
Nystatin	50		Fungi, yeasts
Penicillin-G	100 U/mL	10,000 U/mL	Bacteria, gram positive
Polymixin B	50	1 mg/mL	Bacteria, gram negative
Streptomycin SO_4	100	20 mg/mL	Bacteria, gram positive and gram negative
Tetracyclin	10	35	Bacteria, gram positive and gram negative
Tylosin	10	300	Mycoplasma

After Paul, 1975.

جدول ۵-۶: اجزاء تشکیل دهنده سرم

Constituent	Range of concentration[a]
Proteins and Polypeptides	40–80 mg/mL
Albumin	20–50 mg/mL
Fetuin[b]	10–20 mg/mL
Fibronectin	1–10 μg/mL
Globulins	1–15 mg/mL
Protease inhibitors: α_1-antitrypsin, α_2-macroglobulin	0.5–2.5 mg/mL
Transferrin	2–4 mg/mL
Growth factors:	
EGF, PDGF, IGF-I and -II, FGF, IL-1, IL-6	1–100 ng/mL
Amino acids	0.01–1.0 μM
Lipids	2–10 mg/mL
Cholesterol	10 μM
Fatty acids	0.1–1.0 μM
Linoleic acid	0.01–0.1 μM
Phospholipids	0.7–3.0 mg/mL
Carbohydrates	1.0–2.0 mg/mL
Glucose	0.6–1.2 mg/mL
Hexosamine[c]	6–1.2 mg/mL
Lactic acid[d]	0.5–2.0 mg/mL
Pyruvic acid	2–10 μg/mL
Polyamines:	
Putrescine, spermidine	0.1–1.0 μM
Urea	170–300 μg/mL
Inorganics:	0.14–0.16 M
Calcium	4–7 mM
Chlorides	100 μM
Iron	10–50 μM
Potassium	5–15 mM
Phosphate	2–5 mM
Selenium	0.01 μM
Sodium	135–155 mM
Zinc	0.1–1.0 μM
Hormones:	0.1–200 nM
Hydrocortisone	10–200 nM
Insulin	1–100 ng/mL
Triiodothyronine	20 nM
Thyroxine	100 nM
Vitamins:	10 ng–10 μg/mL
Vitamin A	10–100 ng/mL
Folate	5–20 ng/mL

[a]The range of concentrations is very approximate and is intended to convey only the order of magnitude. Data are from Evans and Sanford [1978], and Cartwright and Shah [1994].
[b]In fetal serum only.
[c]Highest in human serum.
[d]Highest in fetal serum.

محیط کشت MEM با افزایش دامنه و غلظت اجزای تشکیل دهنده محیط کشت BME تکامل یافته است. برای سالیان درازی، محیط کشت Eagle’s MEM بیشترین استفاده را در بین محیط‌های کشت داشت. محیط کشت DMEM برای فیبروبلاست‌های موش در مطالعات ترانسفورماسیون و تکثیر ویروس بوجود آمد. در این محیط کشت غلظت اسیدهای آمینه دو برابر، غلظت ویتامین‌ها چهار برابر و برای رسیدن به خاصیت بافری بهتر غلظت HCO_3^- و CO_2 دو برابر محیط کشت MEM می‌باشد. αMEM دارای اسیدهای آمینه و ویتامین‌ها اضافی و همچنین نوکلئوزیدها و اسیدلیپوئیک می‌باشد. این محیط کشت برای انواع مختلفی از سلول‌ها از قبیل سلول‌های خونساز استفاده می‌شود. Ham’s F12 برای کلون کردن سلول‌های CHO در سرم کم توسعه پیدا کرده است. همچنین این محیط کشت به طور گسترده‌ای مخصوصاً برای آزمون‌های کلونوژنیک و کشت اولیه استفاده می‌شود. همچنین محیط کشت Ham’s F12 با محیط کشت DMEM به نسبت حجمی ۵۰:۵۰ ترکیب شده تا یک سازش میان غلظت‌های بالا و یک دامنه وسیع از اجزاء به وجود آید. ترکیب حاصل برای بسیاری از کشت‌های اولیه بیشتر رده‌های سلولی سخت رشد و به عنوان محیط کشت پایه برای محیط‌های کشت بدون سرم استفاده می‌شود.

محیط های کشت CMRL1066 ، M199 و Waymouth همگی برای رشد سلول‌های L929 در یک محیط کشت فاقد سرم بوجود آمده‌اند اما به صورت تنها و یا ترکیب با محیط‌های کشت دیگر از قبیل DMEM یا F12 برای انواع شرایط سخت‌تر استفاده می‌شوند. محیط‌های کشت RPMI 1640 و Fischer برای سلول‌های لنفاوی – مخصوصاً محیط کشت Fischer برای سلول‌های لنفومای L5178Y که فولات را به میزان زیاد نیاز دارند ـ بوجود آمده‌اند. خصوصاً محیط کشت RPMI 1640 علیرغم این که برای کشت‌های سوسپانسیون طراحی شده و فاقد کلسیم می‌باشد، دارای موارد مصرف کاملاً گسترده، اغلب برای سلول‌های چسبنده می‌باشد. محیط کشت L15 برای ایجاد خاصیت بافری در غیاب HCO_3^- و CO_2 طراحی شده است. اغلب به این دلیل این محیط کشت بعنوان یک محیط کشت انتقالی و محیط کشت اولیه استفاده می‌شود. اما با ابداع HEPES و مشخص شدن این که اغلب HCO_3^- و CO_2 برای رشد سلولی بهینه مورد نیاز می‌باشد، از ارزش آن کاسته شد.

معمولاً اطلاعات در مورد انتخاب محیط کشت مناسب برای یک نوع سلول، در مقالاتی که در مورد آن سلول می‌باشد وجود دارد. همچنین می‌توان اطلاعاتی را از منبع سلول به دست آورد. بانک‌های سلولی مثل ATCC و ECACC اطلاعاتی در مورد محیط‌های کشت مورد استفاده برای رده‌های سلولی موجود فراهم ساخته و همچنین اینگونه اطلاعات را می‌توان از وب سایت‌های آنها به دست آورد. در غیر این صورت می‌توان محیط کشت را به صورت تجربی یا با آزمایشات مقایسه‌ای چندین محیط کشت، همانند انتخاب سرم مشخص کرد.

بسیاری از رده‌های سلولی پیوسته (مثل سلول‌های HeLa، L929، BHK21) کشت‌های اولیه فیبروبلاست‌های انسانی، جوندگان و ماکیان و رده‌های سلولی که از آنها سرچشمه گرفته را می‌توان بر روی یک محیط کشت نسبتاً ساده از قبیل

Eagle's MEM که با سرم گوساله تکمیل شده است نگهداری کرد. وقتی قرار است یک فعالیت اختصاصی بیان شود یا زمانی که سلول‌ها در دانسیته بذرافشانی پایین مثلاً در کلونینگ واکشت داده می‌شوند (۱۰/mL^{۳}×۱>) ممکن است به محیط‌های کشت پیچیده نیاز باشد. اغلب شرایط کشت سخت‌تر به محیط‌های کشت پیچیده نیاز دارد، همچنین به جای سرم گوساله یا اسب به سرم جنین گاو احتیاج دارد، مگر این که فرمولاسیون اجازه حذف سرم را بدهد.

بعضی از پیشنهادها برای انتخاب محیط کشت و چندین نمونه از انواع سلولی و محیط‌های کشت مورد استفاده برای آنها در جدول۶-۶ آورده شده است. اگر اطلاعات در دسترس نباشد، یک آزمایش رشد سلولی ساده با محیط‌های کشت موجود و پلیت‌های چاهک‌دار می‌تواند در حدود دو هفته انجام گیرد. سنجش رشد کلونال و اندازه‌گیری بیان فعالیت اختصاصی ممکن است انتخاب را محدودتر سازند. ممکن است شما تعجب کنید که چرا بهترین شرایط شما با شرایطی که در مقالات وجود دارد موافق نمی‌باشد؛ به دلیل تغییرات در تهیه یا تغییر شرکت سازنده، ناخالصی‌های موجود در مواد و آب و تفاوت بین بچ‌های، سرم ممکن است ایجاد شرایط مشابه با آزمایشگاههای دیگر مشکل باشد. انتظار می‌رود که هر چقدر نیاز به سرم کاهش یافته و خلوص مواد افزایش یابد، استانداردسازی محیط‌های کشت بهبود پیدا کند.

نهایتاً ممکن است شما در انتخاب محیط کشت یا سرم به دلیل هزینه آنها مجبور باشید مصالحه کنید. محیط‌های کشت قابل اتوکلاو از شرکت‌های تجاری موجود می‌باشند. آماده‌سازی این محیط‌های کشت از پودر ساده بوده و برای بسیاری از سویه‌های سلولی پیوسته مناسب می‌باشد. ممکن است لازم باشد که این محیط‌های کشت برای اکثر سلول‌ها با گلوتامین تکمیل شده و معمولاً به سرم نیاز دارند. وقتی که راندمان سلولی مهم نمی‌باشد هزینه سرم باید براساس حجم محیط کشت محاسبه شود اما اگر هدف تولید مقادیر زیادی از سلول‌ها می‌باشد، باید هزینه سرم برحسب سلول محاسبه شود. بنابراین اگر یک کشت در سرم A تا ۱۰/mL^{۶} و در سرم B تا mL/ ۱۰^{۶}×۲ رشد کند، سرم B ارزانتر می‌شود.

اگر سرم جنین گاو ضروری به نظر می‌رسد، مخلوط کردن آن با سرم گوساله را آزمایش کنید. این امر ممکن است به شما امکان دهد که غلظت سرم جنینی گران‌تر را کاهش دهید. در صورتی که بتوانید، سرم را به طور کامل حذف کرده یا غلظت آن را کاهش داده و از یک فرمولاسیون بدون سرم استفاده کنید.

ذخیره بچ

ممکن است تغییرات قابل توجهی میان بچ‌های سرم قابل انتظار باشد. این تغییرات از روش‌های مختلف تهیه و استریلیزاسیون، شرایط ذخیره‌سازی و سنی مختلف و تغییرات در استوکهای حیوانی که سرم از آنها بدست آمده، شامل نژادهای مختلف و تفاوت‌های تغذیه‌ای، آب و هوا و شرایط محیطی دیگر می‌باشد. وقتی یک بچ انتخاب شد، آن را در طی طولانی‌ترین زمان ممکن مصرف کرده و نهایتاً آن را با یک نمونه‌ای که تا حد امکان مشابه بچ اولیه باشد جایگزین کنید.

استانداردسازی سرم مشکل می‌باشد، زیرا بچ‌ها خیلی متفاوت می‌باشند و یک بچ که در دمای ۲۰°C- ذخیره شود، فقط در حدود شش ماه دوام دارد. نوع سرمی را که برای کار شما مناسب می‌باشد، انتخاب کرده و بچ‌هایی را از تعداد شرکت‌های مختلف تهیه کنید. اغلب شرکت‌های تولید کننده سرم، معمولاً یک بچ را ذخیره کرده تا مشتری قادر به انتخاب مناسب‌ترین نمونه باشد (به شرطی که این کار بیش از سه هفته طول نکشد).

آزمایش سرم

کیفیت یک سرم معین توسط شرکت تهیه کننده تضمین می‌شود، اما کنترل کیفیت دقیق معمولاً با یکی از رده‌های سلولی پیوسته انجام می‌شود. اما اگر نیازهای شما متمایز می باشد، لازم است که شما خودتان آزمایشات را انجام دهید. چهار پارامتر اصلی برای آزمایش سرم وجود دارد:

کارایی پلیتینگ (plating efficiency): در طی کلونینگ، سلولها در دانسیته پائین بوده و بنابراین در حساس‌ترین حالت خود می‌باشند. سلول‌ها را به میزان ۱۰۰-۱۰ سلول در میلی‌لیتر کشت داده و پس از ۱۰ روز تا دو هفته کلنی‌ها را بررسی کنید. کلنی‌ها را رنگ کرده و شمارش کنید و در جستجوی اختلافات در کارایی پلیتینگ (بقاء) و اندازه کلنی (تکثیر سلولی) باشید. هر سرمی باید در محدوده‌ای از غلظت‌ها از ٪ ۲ تا ٪۲۰ آزمایش شود. این کار آشکار خواهد کرد که آیا یک سرم در غلظت پایین‌تر به همان اندازه موثر می‌باشد، که در نتیجه باعث صرفه‌جویی در هزینه‌ها و افزایش طول عمر بچ می‌شود و هرگونه سمیتی را در غلظت سرمی بالا آشکار می‌سازد.

منحنی رشد: یک منحنی رشد باید برای هر رشد سلولی در هر سرم رسم شود به طوری که دوره lag، زمان دو برابر شدن و دانسیته اشباع (دانسیته در فاز سکون) را بتوان تعیین کرد. یک دوره lag طولانی دلالت بر این دارد که کشت در حال سازگار شدن با سرم می‌باشد، در صورت نیاز به مقدار زیاد سلول در زمان کم، زمان‌های دو برابر شدن کوتاه ترجیح داده می‌شود، و یک دانسیته اشباع بالا، سلول‌های بیشتری را برای یک مقدار معین از سرم فراهم ساخته و اقتصادی‌تر خواهد بود.

حفاظت ازخصوصیات کشت سلولی: سلول‌ها باید نقشی را که شما از آنها انتظار دارید مثلاً به عنوان میزبان برای یک ویروس معین، تولید یک محصول سلولی مشخص، تمایز یا

جدول ۶-۶: انتخاب یک محیط کشت مناسب

Cells or cell line	Medium	Serum
3T3 cells	MEM, DMEM	CS
Chick embryo fibroblasts	Eagle's MEM	CS
Chinese hamster ovary (CHO)	Eagle's MEM, Ham's F12	CS
Chondrocytes	Ham's F12	FB
Continuous cell lines	Eagle's MEM, DMEM	CS
Endothelium	DMEM, M199, MEM	CS
Fibroblasts	Eagle's MEM	CS
Glial cells	MEM, DMEM/F12	FB
Glioma	MEM, DMEM/F12	FB
HeLa cells	Eagle's MEM	CS
Hematopoietic cells	RPMI 1640, Fischer's, αMEM	FB
Human diploid fibroblasts	Eagle's MEM	CS
Human leukemia	RPMI 1640	FB
Human tumors	L15, RPMI 1640, DMEM/F12	FB
Keratinocytes	αMEM	FB
L cells (L929, LS)	Eagle's MEM	CS
Lymphoblastoid cell lines (human)	RPMI 1640	FB
Mammary epithelium	RPMI 1640, DMEM/F12	FB
MDCK dog kidney epithelium	DMEM, DMEM/F12	FB
Melanocytes	M199	FB
Melanoma	MEM, DMEM/F12	FB
Mouse embryo fibroblasts	Eagle's MEM	CS
Mouse leukemia	Fisher's, RPMI 1640	FB, HoS
Mouse erythroleukemia	DMEM/F12, RPMI 1640	FB, HoS
Mouse myeloma	DMEM, RPMI 1640	FB
Mouse neuroblastoma	DMEM, DMEM/F12	FB
Neurons	DMEM	FB
NRK rat kidney fibroblasts	MEM, DMEM	CS
Rat minimal-deviation hepatoma (HTC, MDH)	Swim's S77, DMEM/F12	FB
Skeletal muscle	DMEM, F12	FB, HoS
Syrian hamster fibroblasts (e.g., BHK 21)	MEM, GMEM, DMEM	CS

Abbreviations: CS, calf serum; FB, fetal bovine serum; HoS, horse serum. SF12 is Ham's F12 plus Eagle's essential amino acids and nonessential amino acids as in DMEM (available as 100× stock, *see* Appendix II). Further recommendations on the choice of medium can be found in McKeehan [1977], Barnes et al. [1984(a–d)], and Mather [1998].

بیان یک خصوصیت و حساسیت به یک داروی مشخص.را در سرم جدید ایفا کنند.

استریلیتی: سرم شرکت‌های معروف آزمایش شده و نشان داده می‌شود که عاری از میکرو ارگانیسم‌ها می‌باشد. هر چند در موارد نادری که یک نمونه سرم آلوده از مرحله کنترل کیفیت عبور می‌کند، باید در غربالگری برای میکوپلاسما، آلودگی آن آشکار شود.

غیر فعال سازی حرارتی

سرم با انکوبه شدن در دمای ۵۶°C به مدت ۳۰ دقیقه با حرارت غیرفعال می‌شود. سپس ممکن است در مقادیر کوچکتر توزیع شده و در دمای ۲۰°C- ذخیره شود. در ابتدا، حرارت دادن برای غیرفعال کردن کمپلمان برای سنجش‌های ایمنی طراحی شد اما ممکن است اثرات دیگر آن هنوز مشخص نشده باشد. ادعای اینکه غیرفعال سازی با حرارت میکوپلاسما را برطرف می‌کند احتمالاً بی‌اساس می‌باشد، هر چند تیمار حرارتی ممکن است تیتر بعضی میکوپلاسماها را کاهش دهد.

مکمل‌های دیگر

علاوه بر سرم، عصاره‌های بافت و محصولات حاصل از هضم به صورت سنتی به عنوان مکمل‌هایی برای محیط‌های کشت بافت استفاده می‌شده‌اند.

هیدرولیزات‌های اسید آمینه

بسیاری از چنین مکمل‌هایی از تکنیک‌های کشت میکروبیولوژیکی و براث‌های قابل اتوکلاو منشاء گرفته‌اند. باکتوپپتون، تریپتوز و لاکتالبومین هیدرولیزات، هضم شده های پروتئولیتیک قلب گاو یا لاکتالبومین بوده و حاوی اسیدهای آمینه اساسی و پپتیدهای کوچک می‌باشند. همچنین ممکن است باکتوپپتون و تریپتوز حاوی نوکلئوزیدها و دیگر اجزای بافتی مقاوم به حرارت مثل اسیدهای چرب و کربوهیدرات‌ها باشند.

عصاره جنین

عصاره جنین یک ترکیب یکنواخت خام از جنین ۱۰ روزه جوجه می‌باشد که با سانتریفوژ کردن صاف شده است. عصاره خام توسط Coon و Cahn به قسمت‌های کوچکتر تقسیم شد تا قسمت های با وزن ملکولی کم یا زیاد به دست آید. قسمت با وزن ملکولی پایین، تکثیر سلولی را افزایش می‌دهد. هر چند Coon و Cahn به طور کامل این قسمت‌ها را مشخص نکردند، شواهد اخیر نشان می‌دهد که قسمت با وزن ملکولی کم احتمالاً حاوی فاکتورهای رشد پپتیدی بوده و قسمت با وزن ملکولی بالا حاوی پروتئوگلیکانها و دیگر اجزاء تشکیل دهنده ماتریکس می‌باشند.

عصاره جنین در ابتدا به عنوان یک جزء از لخته‌های پلاسما برای افزایش مهاجرت سلولی از بافت کشت داده شده استفاده می‌شد و در بعضی از تکنیک‌های کشت اندام حفظ شده است.

محیط کشت شرطی

Puck و Marcus مشخص کردند که بقاء کشت‌های با دانسیته پایین را می‌توان با رشد دادن سلول‌ها در حضور لایه‌های تغذیه کننده بهبود بخشید. این اثر احتمالاً به دلیل

ترکیبی از تاثیرات به انضمام شرطی کردن بستر و شرطی کردن محیط کشت با آزادسازی متابولیت‌ها و فاکتورهای رشد در آن می باشد. Hauschka و Konigsberg نشان دادند که شرطی کردن محیط کشت رشد که برای رشد و تمایز میوبلاست‌ها ضروری می‌باشد به دلیل کلاژن آزاد شده توسط سلول‌های تغذیه کننده می‌باشد. استفاده از لایه‌های تغذیه کننده و شرطی کردن محیط کشت با فیبروبلاست‌های جنینی یا رده‌های سلولی دیگر یک روش با ارزش برای کشت دادن سلول‌های سخت رشد می‌باشد.

تلاش‌هایی برای جداسازی قسمت‌های فعال از محیط کشت شرطی انجام گرفته است. محیط کشت شرطی حاوی هم اجزاء ماتریکس تغییر دهنده بستر شبیه کلاژن، فیبرونکتین و پروتئوگلیکانها و هم فاکتورهای رشدی از قبیل گروه باند شونده به هپارین (FGF و غیره)، فاکتورهای رشد شبیه انسولین (IGF-I و II) ، PDGF و چندین نوع دیگر به اضافه متابولیت‌های واسطه‌ای که قبلاً پیشنهاد شده بود، می‌باشد. هر چند محیط کشت شرطی ترکیبات نامشخص را به محیط کشت افزوده و باید بعد از اینکه اجزاء تشکیل دهنده فعال مشخص شدند، برطرف گردند.

فصل هفتم

محیط‌های کشت بدون سرم

هر چند هنوز هم برای اکثر رده‌های سلولی لازم است که محیط کشت رشد آنها با سرم تکمیل شود، امروزه در بسیاری از موارد امکان تکثیر کشت‌ها در محیط های کشت فاقد سرم وجود دارد. نیاز برای ۱) استانداردسازی محیط های کشت در بین آزمایشگاه ها ۲) تهیه محیط های کشت اختصاصی برای انواع سلولهای اختصاصی و ۳) حذف محصولات طبیعی متغیر، منجر به توسعه محیط های کشت پیچیده تر از قبیل M199، Waymouth's MB ،NCTC109 ،CMRL 1066، 572/1، NCTC135 و Birch و Pirt برای سلولهای فیبروبلاست موشی و محیط های کشت رشد کلونال Ham's F10 و F12 برای سلولهای تخمدان هامستر چینی(CHO) شده است. همچنین محیط های کشت فاقد سرم برای سلولهای HeLa توسعه پیدا کرده است. در حالی که در سازگاری رده‌های سلولی پیوسته به شرایط بدون سرم ممکن است یک درجه‌ای از انتخاب وجود داشته باشد، محیط های کشت سری MCDB، محیط های کشت بر پایه Sato's DMEM/F12 و محیط های کشت دیگر بر پایه RPMI 1640 ثابت کرده‌اند که می‌توان در صورتیکه تغییرات غذایی و هورمونی مناسب در محیط‌های کشت ایجاد شود، سرم را بدون هیچگونه سازگاری سلولی آشکاری کاهش داده و یا حذف کرد. همچنین این محیط‌ها شرایط انتخابی را برای کشت اولیه انواع سلولی خاص فراهم می‌سازد. فرمولاسیون‌های اختصاصی (مثل MCDB 110) برای کشت فیبروبلاست‌های انسانی، بسیاری از سلول‌های نرمال و نئوپلاستی موشی و انسانی، لنفوبلاستها و چندین نوع مختلف کشت‌های اولیه در غیاب سرم که در چندین مورد مقداری پروتئین به آنها اضافه شده است، به وجود آمده است. امروزه این محیط‌های کشت، محدوده وسیعی از سلول‌ها را شامل شده و بسیاری از محیط‌های کشت به صورت تجاری موجود می‌باشند.

معایب سرم

استفاده از سرم در محیط کشت دارای معایبی می‌باشد:

۱) **تغییرپذیری فیزیولوژیکی:** اجزای اصلی تشکیل دهنده‌ی سرم از قبیل آلبومین و ترانسفرین شناخته شده می‌باشند اما سرم حاوی محدوده‌ی وسیعی از اجزای جزئی می‌باشد که ممکن است تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی رشد سلولی داشته باشند. این اجزاء شامل مواد مغذی (اسیدهای آمینه، نوکلئوزیدها، قندها و غیره)، فاکتورهای رشد پپتیدی، هورمون‌ها، مواد معدنی و لیپیدها می‌باشد که غلظت و فعالیت آنها به طور کامل مشخص نشده است.

۲) **نیمه عمر و پایداری (shelf life and consistency):** سرم از یک بچ به بچ دیگر متفاوت بوده و در بهترین شرایط یک سال باقی مانده اما ممکن است در طی این مدت خراب شود. بنابراین باید با بچ مشابه دیگر که هرگز همانند بچ اول نخواهد بود، جایگزین گردد.

۳) **کنترل کیفیت:** برای تغییر بچ‌های سرم لازم است که آزمایشات وسیعی صورت گرفته تا اطمینان حاصل شود که سرم جایگزین بیشترین تشابه را با بچ قبلی دارد. این کار می‌تواند شامل چندین آزمایش (رشد، کارایی پلیتینگ و فعالیت‌های اختصاصی) تعدادی از رده‌های سلولی مختلف باشد.

۴) **اختصاصیت:** در صورت استفاده همزمان از چندین نوع سلول، ممکن است هر نوع سلول به یک بچ متفاوت نیاز داشته باشد به گونه‌ای که باید چندین بچ به طور همزمان به صورت ذخیره نگه‌داری شود. کشت توام انواع سلول‌های مختلف، حتی مشکل را از این هم بیشتر خواهد کرد.

۵) **دسترسی:** گاهی اوقات به دلیل خشکسالی در نواحی پرورش گاو، انتشار بیماری در میان گاوها یا به دلایل اقتصادی یا سیاسی، تهیه سرم محدود خواهد شد. امروزه

جدول ۱-۷: نمونه هایی از فرمولاسیون های محیط های کشت فاقد سرم

Medium		MCDB 110	MCDB 131	MCDB 170	MCDB 202	MCDB 302	MCDB 402	WAJC 404	MCDB 153	Iscove's	LHC-9
Cell type		Human lung fibroblasts	Human vascular endothelium	Mammary epithelium	Chick embryo fibroblasts	CHO cells	3T3 cells	Prostatic epithelium[1]	Keratinocytes	Lymphoid cells	Bronchial epithelium
Reference		Bettger et al., 1981	Knedler & Ham, 1987; Gupta et al., 1997	Hammond et al., 1984	McKeehan & Ham, 1976b	Hamilton & Ham, 1977	Shipley & Ham, 1983	McKeehan et al., 1984; Chaproniere & McKeehan, 1986	Peehl & Ham, 1980	Iscove & Melchers, 1978	Lechner & LaVeck, 1985
Component	Mol. wt.										
Amino acids											
L-alanine	89	1.0E-04	3.0E-05	1.0E-04	1.0E-04		1.0E-04	1.0E-04	2.8E-04	1.0E-04	
L-arginine	211	1.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-03	3.0E-04	1.0E-03	1.0E-03	4.0E-04	2.0E-03
L-asparagine	132	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-03	1.0E-03	1.1E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.9E-04	1.0E-04
L-aspartic acid	133	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	2.3E-04	3.0E-05
L-cysteine	176	5.0E-05	2.0E-04	7.0E-05	2.0E-04	1.0E-04			2.4E-04		2.4E-04
L-cystine	240			2.0E-04	2.0E-04		4.0E-04	2.4E-04		2.9E-04	
L-glutamic acid	147	1.0E-04	3.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	5.1E-04	1.0E-04
L-glutamine	146	2.5E-03	1.0E-02	2.0E-03	1.0E-03	3.0E-03	5.0E-03	6.0E-03	6.0E-03	4.0E-03	6.0E-03
Glycine	75	3.0E-04	3.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	4.0E-04	1.0E-04
L-histidine	210	1.0E-04	2.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	2.0E-03	8.0E-05	8.0E-05	2.0E-04	1.6E-04
L-isoleucine	131	3.0E-05	5.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	3.0E-05	1.0E-03	1.5E-05	1.5E-05	8.0E-04	3.0E-05
L-leucine	131	1.0E-04	1.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	2.0E-03	5.0E-04	5.0E-04	8.0E-04	1.0E-03
L-lysine HCl	183	2.0E-04	1.0E-03	2.0E-04	2.0E-04	2.0E-04	8.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	8.0E-04	2.0E-04
L-methionine	149	3.0E-05	1.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	2.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	2.0E-04	6.0E-05
L-phenylalanine	165	3.0E-05	2.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	3.0E-04	3.0E-05	3.0E-05	4.0E-04	6.0E-05
L-proline	115	3.0E-04	1.0E-04	5.0E-05	5.0E-05	3.0E-04		3.0E-04	3.0E-04	3.5E-04	3.0E-04
L-serine	105	1.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	6.0E-04	6.0E-04	4.0E-04	1.2E-03
L-threonine	119	1.0E-04	1.0E-04	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	5.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	8.0E-04	2.0E-04
L-tryptophan	204	1.0E-05	2.0E-05	3.0E-05	3.0E-05	1.0E-05	1.0E-05	1.5E-05	1.5E-05	7.8E-05	3.0E-05
L-tyrosine	181	3.5E-05	1.0E-04	5.0E-05	5.0E-05	4.4E-05	2.0E-04	1.5E-05	1.5E-05	4.6E-04	3.0E-05
L-valine	117	1.0E-04	1.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	1.0E-04	2.0E-03	3.0E-04	3.0E-04	8.0E-04	6.0E-04
Vitamins											
Biotin	244	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	6.0E-08	6.0E-08	5.3E-08	6.0E-08
Choline chloride	140	1.0E-04		1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	2.0E-05	2.0E-04
Folic acid	441		1.0E-04			3.0E-06		1.8E-06	1.8E-06	9.1E-06	1.8E-06
Folinic acid	512	1.0E-09	1.0E-06	1.0E-08	1.0E-08		1.0E-06				
myo-Inositol	180	1.0E-04	4.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	1.0E-04	4.0E-05	1.0E-04	1.0E-04	4.0E-05	1.0E-04
Nicotinamide	122	5.0E-05	5.0E-05	5.0E-05	5.0E-05	3.0E-07	5.0E-05	3.0E-07	3.0E-07	3.3E-05	3.0E-07
Pantothenate	238	1.0E-06	5.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-06	5.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.7E-05	1.0E-06
Pyridoxal HCl	204									2.0E-05	
Pyridoxine HCl	206	3.0E-07	1.0E-05	3.0E-07	3.0E-07	3.0E-07	1.0E-04	3.0E-07	3.0E-07		3.0E-07
Riboflavin	376	3.0E-07	1.0E-08	3.0E-07	3.0E-07	1.0E-07	1.0E-06	1.0E-07	1.0E-07	1.1E-06	1.0E-07
Thiamin HCl	337	1.0E-06	1.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-04	1.0E-06	1.0E-06	1.2E-05	1.0E-06
α-Tocopherol	430	1.4E-07									
Retinoic acid	300										3.3E-07
Retinol acetate	329	4.2E-07									
Vitamin B_{12}	1355	1.0E-07	1.0E-08	1.0E-07	1.0E-07	1.0E-07	1.0E-08	3.0E-07	3.0E-07	9.6E-09	3.0E-07
Antioxidants											
Dithiothreitol	154	6.5E-06									
Glutathione	307	6.5E-07									
Inorganic salts											
$CaCl_2$	147	1.0E-03	1.6E-03	2.0E-03	2.0E-03	6.0E-04	1.6E-03	1.3E-04	3.0E-05	1.5E-03	1.1E-04
KCl	75	5.0E-03	4.0E-03	3.0E-03	3.0E-03	3.0E-03	4.0E-03	1.5E-03	1.5E-03	4.4E-03	1.5E-03

جدول ۱–۷: نمونه هایی از فرمولاسیون های محیط کشت فاقد سرم(ادامه)

	Medium	MCDB 110	MCDB 131	MCDB 170	MCDB 202	MCDB 302	MCDB 402	WAJC 404	MCDB 153	Iscove's	LHC-9
Cell type		Human lung fibroblasts	Human vascular endothe-lium	Mammary epithelium	Chick embryo fibroblasts	CHO cells	3T3 cells	Prostatic epithelium[1]	Keratinocytes	Lymphoid cells	Bronchial epithelium
Reference		Bettger et al., 1981	Knedler & Ham, 1987; Gupta et al., 1997	Hammond et al., 1984	McKeehan & Ham, 1976b	Hamilton & Ham, 1977	Shipley & Ham, 1983	McKeehan et al., 1984; Chaproniere & McKeehan, 1986	Peehl & Ham, 1980	Iscove & Melchers, 1978	Lechner & LaVeck, 1985
Component	Mol. wt.										
KNO_3	160					1.6E-08				7.5E-07	
$MgCl_2$	203					6.0E-04		6.0E-04	6.0E-04		2.2E-02
$MgSO_4$	247	1.0E-03	1.0E-02	1.5E-03	1.5E-03	6.1E-10	8.0E-04			8.1E-04	
NaCl	58	1.1E-01	1.1E-01	1.2E-01	1.2E-01	1.3E-01	1.2E-01	1.2E-01	1.2E-01	7.7E-02	1.0E-01
$NaHCO_3$	84		1.4E-02			1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	1.4E-02	3.6E-02	1.2E-02
NA_2HPO_4	120	3.0E-03	5.9E-04	5.0E-04	5.0E-04	1.2E-03	5.0E-04	2.0E-03	2.0E-03	1.0E-03	2.0E-03
Trace elements											
$CuSO_4{\cdot}5H_2O$	160	1.0E-09	7.5E-09	1.0E-09	1.0E-09		5.0E-09	1.0E-09	1.1E-08		1.0E-08
$FeSO_4$	278	5.0E-06	1.0E-06	5.0E-06	5.0E-06	3.0E-06	1.0E-06	5.0E-06	5.0E-06		5.4E-04
$MnSO_4{\cdot}H_2O$	169	1.0E-09	1.2E-09	5.0E-10	5.0E-10		1.0E-09	1.0E-09	1.0E-09		1.0E-09
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	1236	1.0E-09	3.0E-09	1.0E-09	1.0E-09	1.0E-08	3.0E-09	1.0E-09	1.0E-09		1.0E-09
$NiCl_2$	238	5.0E-10	4.2E-10	5.0E-12	5.0E-12		3.0E-10	5.0E-10	5.0E-10		5.0E-10
H_2SeO_3	129	3.0E-08		3.0E-08	3.0E-08	1.3E-08	1.0E-08	3.0E-08	3.0E-08	1.0E-07	3.0E-08
Na_2SiO_3	122	5.0E-07	2.3E-05	5.0E-07	5.0E-07		1.0E-05	5.0E-07	5.0E-07		5.0E-07
$SnCl_2$	190	5.0E-10		5.0E-12	5.0E-12			5.0E-10	5.0E-10		5.0E-10
NH_4VO_3	117	5.0E-09	5.1E-09	5.0E-09	5.0E-09	1.0E-08	5.0E-09	5.0E-09	5.0E-09		5.0E-09
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	288	5.0E-07	1.0E-09	1.0E-07	1.0E-07	3.0E-06	1.0E-06	5.0E-07	5.0E-07		4.8E-07
Lipids and precursors											
Cholesterol	387	7.6E-06									
Ethanolamine	61			1.0E-04					1.0E-04		
Linoleic acid	280			2.0E-07	2.0E-07	3.0E-07	3.0E-07				
Lipoic acid	206	1.0E-08	1.0E-08	1.0E-08	1.0E-08	9.8E-07	1.0E-08	1.0E-06	1.0E-06		1.0E-06
Phosphoethanolamine	141			1.0E-04							5.0E-07
Soya lecithin, µg/mL		6									
Soybean lipid, µg/mL										50	
Sphingomyelin, µg/mL		1									
Hormones and growth factors											
EGF, ng/mL		30		10				25	25		5
Epinephrine	183										2.7E-06
Hydrocortisone[2]	362	5.0E-07		1.4E-07				5.0E-07	1.4E-07		2.0E-07
Insulin. µg/mL		1		5				10	5		5
Prolactin, µg/mL		1		5							
PGE_1	355	2.5E-08							2.5E-08		
Triiodothyronine	673										1.0E-08
Nucleosides, etc.											
Adenine SO_4	184	1.0E-05	1.0E-06	1.0E-06	1.0E-06		1.0E-06	1.8E-04	1.8E-04		1.8E-04
Hypoxanthine	136					3.0E-05					
Thymidine	242	3.0E-07	1.0E-07	3.0E-07	3.0E-07		1.0E-06	3.0E-06	3.0E-06		3.0E-06
Energy metabolism											
D-glucose	180	4.0E-03	5.6E-03	8.0E-03	8.0E-03	1.0E-02	5.5E-03	6.0E-03	6.0E-03	2.5E-02	6.0E-03
Phosphoenolpyruvate	190	1.0E-05									

جدول ۱-۷: نمونه هایی از فرمولاسیون های محیط های کشت فاقد سرم(ادامه)

	Medium	MCDB 110	MCDB 131	MCDB 170	MCDB 202	MCDB 302	MCDB 402	WAJC 404	MCDB 153	Iscove's	LHC-9
Cell type		Human lung fibroblasts	Human vascular endothelium	Mammary epithelium	Chick embryo fibroblasts	CHO cells	3T3 cells	Prostatic epithelium[1]	Keratinocytes	Lymphoid cells	Bronchial epithelium
Reference		Bettger et al., 1981	Knedler & Ham, 1987; Gupta et al., 1997	Hammond et al., 1984	McKeehan & Ham, 1976b	Hamilton & Ham, 1977	Shipley & Ham, 1983	McKeehan et al., 1984; Chaproniere & McKeehan, 1986	Peehl & Ham, 1980	Iscove & Melchers, 1978	Lechner & LaVeck, 1985
Component	Mol. wt.										
Sodium acetate $3H_2O$	136					1.0E		3.7E-03	3.7E-03		3.7E-03
Sodium pyruvate	110	1.0E-03	1.0E-03	1.0E-03	5.0E-04	1.1E+02		5.0E-04	5.0E-04	1.0E-03	5.0E-04
Other components											
Cholera toxin	~90,000							2.0E-10			
HEPES, Na salt	260	3.0E-02		3.0E-02	3.0E-02			2.8E-02	2.8E-02	2.5E-02	2.3E-02
Phenol red	376	3.3E-06	3.3E-05	3.3E-06	3.3E-06	3.3E-06	3.3E-05	3.3E-05	3.3E-05	4.0E-05	3.3E-06
Putrescine 2HCl	161	1.0E-09	1.2E-09	1.0E-09	1.0E-09	1.0E-06	1.0E-09	1.0E-06	1.0E-06		1.0E-06
Protein supplements											
BPE, μgP/mL[3]		70						25			35
BSA, mg/mL										0.5–10	
Dialyzed FBS, μgP/mL									1		
Transferrin, Fe^{3+} saturated, μg/mL				5						30–300	10
Gas phase											
CO_2	44	2%	5%	2%	2%	5%	5%	5%	5%	10%	5%

[1]See also complete PFMR-4A [Peehl, 2002]. [2]Soluble analogs of hydrocortisone, such as dexamethasone, can be used. [3]Ovine prolactin can be substituted for BPE. Most concentrations are molar, and computer-style notation is used, e.g., 3.0E-2 = 3.0×10^{-2} = 30 mM. Molecular weights are given for root compounds; although some recipes use salts or hydrated forms, molarities will, of course, remain the same. The units are given in the component column where molarity is not used. *Abbreviations:* BPE, bovine pituitary extract; BSA, bovine serum albumin; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum. See text for references.

تقاضا برای سرم رو به افزایش بوده و احتمالاً بیش از میزان تولید خواهد شد مگر اینکه اکثر مصرف کنندگان تجاری قادر به سازگاری به محیط های کشت فاقد سرم باشند. در حالی که یک آزمایشگاه تحقیقاتی متوسط ممکن است در طول سال ۲۰۰-۱۰۰ لیتر سرم مصرف کند، یک آزمایشگاه بیوتکنولوژی تجاری می‌تواند این مقدار و یا بیشتر را در عرض یک هفته مصرف کند.

۶) **فرآوری پایین دستی (downstream processing):** حضور سرم برای افرادی که خواهان بازیابی محصولات سلولی می‌باشند، یک مانع بزرگ برای خالص‌سازی بوده و حتی ممکن است پذیرش محصول به عنوان دارو را محدود کند.

۷) **آلودگی:** سرم، اغلب با ویروس‌ها آلوده می‌باشد که ممکن است اکثر آنها برای کشت سلولی مضر باشند اما یک فاکتور ناشناخته اضافی، خارج از کنترل اپراتور را ارائه می‌کنند. خوشبختانه اصلاحات به وجود آمده در تکنیک‌های استریل کردن سرم، خطر عفونت میکوپلاسمایی را از سرم بسیاری از شرکت‌های تولید کننده معتبر بر طرف کرده است، اما علیرغم ادعاهایی که در مورد فیلترهای جدا کننده ویروس‌ها وجود دارد این موضوع نمی‌تواند برای آلودگی ویروسی تضمین شود.

به دلیل خطر انتشار انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی (Bovine Spongiform Encephalitis) در میان گاوها، کشت‌های سلولی و سرم حمل شده به ایالات متحده یا استرالیا نیازمند اطلاعاتی در مورد کشور مبداء و شماره بچ سرم می‌باشد. احتمالاً سرم حاصل از گاوها در نیوزلند دارای کمترین آلودگی ویروسی درونی می‌باشد، چون بیشتر ویروس‌های یافت شده در گاوهای اروپایی و آمریکای شمالی در نیوزلند یافت نمی‌شوند.

جدول ۲–۷: نمونه هایی از محیط های کشت فاقد سرم؛ محیط های کشت پایه تکمیل شده

Medium	HITES	ACL-3		N3	G3	K-1	K-2			
Reference	Carney et al., 1981	Brower et al., 1986	Masui et al., 1986b	Bottenstein, 1984	Michler-Stuke & Bottenstein, 1982	Taub, 1984	Taub, 1984	Chopra & Xue-Hu, 1993	Robertson & Robertson, 1995	Naeyaert et al., 1991
Cell type	Human small-cell lung carcinoma	Human non-small-cell lung carcinoma	Human lung adeno-carcinoma	Human neuro-blastoma, LA-N-1	Rat glial cells	MDCK (dog kidney)	LLC-PK, (pig kidney)	Human parotid	Human prostate	Human melanocytes
Basal medium	RPMI 1640	RPMI 1640	DMEM/F12	DMEM/F12	DMEM	DMEM/F12	DMEM/F12	MCDB 153	αMEM/F12	M199
Supplements										
Arg VP, μU/mL							10			
BPE, μgP/mL								25	25	
BSA, mg/mL		5.0			0.3					
Cholera toxin										1.0E-09
Cholesterol							1.0E-08			
EGF, ng/mL		10						10	10	1
Epinephrine										
Estradiol	1.0E-08									
Ethanolamine			5.0E-07						1.0E-03	
FGF-2 (basic FGF), ng/mL										10
Glucagon, μg/mL			0.2							
Glutamine (additional)		2.0E-03							2.0E-03	
Hydrocortisone	1.0E-08	5.0E-08				5.0E-08	2.0E-07	1.4E-06	1.0E-06	1.4E-06
Insulin, μg/mL	5.0	20.0	5.0	5.0	0.5	5.0	25.0	5.0	5.0	10.0
Na pyruvate (additional)		5.0E-04								
Na_2SeO_3	3.0E-08	2.5E-08	2.5E-08	3.0E-08						
Phosphoethanol-amine									1.0E-04	
Progesterone				2.0E-08	2.0E-07					
Prolactin										
Prostaglandin E_1						7.0E-08				
Putrescine				1.0E-04	1.0E-07					
Transferrin, Fe^{3+} saturated, μg/mL	100	10		50	100	5	10		5	10
Triiodothyronine		1.0E-10	5.0E-10		4.9E-07	5.0E-12	1.0E-09			1.0E-09
Thyroxine					4.5E-07					

Most concentrations are molar, and computer-style notation is used, e.g., 3.0E-2 = 3.0×10^{-2} = 30 mM. Molecular weights are given for root compounds; although some recipes use salts or hydrated forms, molarities will, of course, remain the same. The units are given in the component column where molarity is not used. Soluble analogs of hydrocortisone, such as dexamethasone, can be used. *Abbreviations:* Arg VP, arginine vasopressin; BPE, bovine pituitary extract; BSA, bovine serum albumin; EGF, epidermal growth factor; FBS, fetal bovine serum; FGF, fibroblast growth factor.

۸) **هزینه:** اغلب، هزینه به عنوان یک عیب غنی‌سازی با سرم می‌باشد. یقیناً قسمت اعظم هزینه یک بطری محیط کشت مربوط به سرم می‌باشد (بیش از ۱۰ برابر هزینه‌ی اجزای تشکیل دهنده شیمیایی) اما اگر سرم با اجزای شناخته شده جایگزین شود، هزینه این اجزا هم به اندازه هزینه سرم بالا می‌باشد. هر چند با افزایش تقاضا برای مواد مثل ترانسفرین، سلنیوم، انسولین و غیره، احتمالاً با افزایش حجم فروش، هزینه پایین‌تر آمده و محیط های کشت بدون سرم ارزان‌تر خواهد شد.

۹) **بازدارنده‌های رشد:** سرم علاوه بر فعالیت افزایش دهنده‌ی رشد، دارای فعالیت بازدارنده رشد هم بوده و هر چند فعالیت تحریک کننده رشد آن معمولاً برجسته‌تر می‌باشد، اثر خالص سرم یک ترکیب غیرقابل پیش‌بینی از هر دو فعالیت بازدارندگی و تحریک کنندگی می‌باشد. در حالی که ممکن است موادی مانند PDGF برای فیبروبلاست‌ها میتوژن باشد، اجزای دیگر سرم می‌توانند سیتواستاتیک باشند. هیدروکورتیزون که در سرم جنینی در غلظت حدود 10^{-8}M وجود دارد، برای انواع زیادی از سلول‌ها از قبیل

گلیا و بافت پوششی ریه در دانسیته‌های سلولی بالا سیتواستاتیک می‌باشد (گمان می‌رود که ممکن است در دانسیته‌های سلولی پایین میتوژنیک باشد) و TGF-β که از پلاکت‌ها آزاد می‌شود، برای اکثر سلول‌های پوششی سیتواستاتیک می‌باشد.

۱۰) **استاندارد سازی:** استاندارد سازی دستورکارهای آزمایشگاهی و تولیدی به دلیل تغییرات بچ به بچ در سرم، هم در زمان‌های مختلف و هم در بین آزمایشگاههای مختلف مشکل می‌باشد.

مزیت‌های محیط های کشت بدون سرم

تمام مشکلات بالا را می توان با حذف سرم و محصولات حیوانی دیگر برطرف کرد. بعلاوه محیط های کشت بدون سرم دو مزیت اصلی دارند:

۱) محیط های کشت انتخابی

یکی از مزیت‌های عمده کنترل بر روی فعالیت افزایش دهنده رشد که در محیط های کشت فاقد سرم ایجاد شده، توانایی ایجاد یک محیط انتخابی برای یک نوع سلول مشخص می‌باشد. اکنون می‌توان مشکل دراز مدت رشد بیش از حد فیبروبلاست‌های زمینه‌ای را در کشت‌های پستان و پوست، با استفاده از MCDB 170 &153 به طور موثر کنترل کرد. می‌توان ملانوسیت‌ها را در غیاب فیبروبلاست‌ها و کراتینوسیت‌ها کشت داد و ممکن است بتوان با انتخاب فاکتور رشد یا گروهی از فاکتورهای رشد صحیح، نژادهای مجزا و حتی مراحل تکامل در سلول‌های خونساز را انتخاب کرد.

۲) تنظیم تکثیر و تمایز

توانایی انتخاب یک نوع سلول اختصاصی را افزایش داده، بعد از تکثیر لازم کشت، امکان تغییر از یک فاکتور رشد به یک فاکتور تمایز یا مجموعه‌ای از فاکتورها را افزایش داده و سپس ممکن است کشت تکثیر داده شود تا یک یا تعداد بیشتری از عملکردهای اختصاصی را انجام دهد.

معایب کشت‌های فاقد سرم

۱) **تعدد محیط‌های کشت:** به نظر می‌رسد هر نوع سلول به یک دستورالعمل متفاوت نیاز داشته و ممکن است نیازهای کشت‌های تومورهای بدخیم در بین تومورهای مختلف و حتی در یک گروه از تومورها متفاوت باشد. هر چند ممکن است این درجه از اختصاصیت، مزیتی برای جداسازی انواع سلول‌های خاص باشد، این امر مشکلی برای آزمایشگاههایی که رده‌های سلولی با چندین منشاء مختلف را نگهداری می‌کنند، ایجاد می‌کند.

۲) **انتخابی بودن:** متاسفانه، انتقال به شرایط بدون سرم، هر چند مطلوب می‌باشد اما آنقدر هم که به نظر می‌رسد ساده نمی‌باشد. ممکن است بعضی از محیط‌های کشت یک زیر دودمان (sub-lineage) را انتخاب کرده که نمونه تیپیک تمام جمعیت نمی‌باشد و حتی ممکن است در رده‌های سلولی پیوسته هنوز به چندین درجه از انتخاب نیاز باشد. سلول‌ها در مراحل مختلف تکامل (مثلاً سلول‌های بنیادی در برابر سلول‌های پیش‌ساز متعهد شده) ممکن است فرمولاسیون‌های مختلفی را مخصوصاً از لحاظ فاکتور رشد و اجزای سیتوکین نیاز داشته باشند.

۳) **خلوص معرف:** برای حذف سرم لازم است که میزان خلوص معرف‌ها و آب و همچنین تمیزی همه وسایل کاملاً بالا باشد، چون حذف سرم باعث رفع فعالیت ضد سمی و محافظت کننده‌ای شده که ممکن است بعضی از پروتئین‌های سرم داشته باشند. در حالی که بی‌شک بر طرف کردن این فعالیت مطلوب است، ممکن است بر حسب منابع همیشه قابل اجرا نباشد.

۴) **تکثیر سلولی:** اغلب رشد در محیط‌های کشت بدون سرم آهسته‌تر بوده و در مورد رده‌های سلولی متناهی تکثیر کمتری صورت می‌پذیرد.

۵) **دسترسی:** علیرغم پیشرفت‌های فزاینده، دسترسی به محیط‌های کشت بدون سرم که به طور صحیح کنترل شده‌اند کاملاً محدود بوده و اغلب، محصولات گرانتر از محیط کشت مرسوم می‌باشند.

جایگزینی سرم

فاکتورهای ضروری موجود در سرم شامل

۱) فاکتورهای اتصال از قبیل فیبرونکتین.

۲) پپتیدهایی از قبیل انسولین، PDGF، TGF-β که رشد و تمایز را تنظیم می‌کنند.

۳) مواد مغذی ضروری از قبیل مواد معدنی، ویتامین‌ها، اسیدهای چرب و متابولیت‌های واسطه.

۴) هورمون‌ها مثل انسولین، هیدروکورتیزون، استروژن و تری یدوترونین که انتقال غشایی، وضعیت فنوتیپی و اجزای تشکیل دهنده سطح سلولی را تنظیم می‌کنند.

واکشت بدون سرم

فاکتورهای اتصال: وقتی که سرم از محیط کشت حذف می‌شود، ممکن است که لازم باشد سطح رشد پلاستیکی را با فیبرونکتین (۲۵-۵۰μg/mL) یا لامینین (۱-۵μg/mL) تیمار کرده یا آنها را به صورت مستقیم به محیط کشت اضافه کرد. مشخص شده است که پیش تیمار پلاستیک با پلی ال- لیزین (۱mg/mL) زیستایی فیبروبلاست‌های دیپلوئید انسانی را افزایش می‌دهد.

بازدارنده‌های پروتئاز: بعد از واکشت توسط تریپسین، افزودن سرم هرگونه فعالیت پروتئولیتیک باقیمانده را مهار

می کند. بنابراین باید بعد از واکشت، بازدارنده‌های پروتئاز از قبیل بازدارنده تریپسین سویا یا ۰/۱mg/mL آپروتینین (aprotinin) به محیط‌های کشت بدون سرم اضافه شود. همچنین چون تریپسین خام مخلوط پیچیده‌ای از پروتئازها می‌باشد، ممکن است بعضی از آنها به بازدارنده‌های متفاوتی نیاز داشته باشند، بنابراین ترجیح داده می‌شود که از تریپسین خالص استفاده شود(مثلاً گرید III از شرکت Sigma). همچنین می‌توان برای خارج کردن تریپسین، سلول‌ها را با سانتریفوژ کردن شستشو داد. امکان دارد که بتوان پروناز را با رقیق کردن در شرایط فاقد سرم بدون خنثی سازی، غیرفعال کرد.

تریپسین و پروتئازهای دیگر: وقتی که سلول‌ها در محیط کشت بدون سرم تریپسینه می‌شوند، چون سلولها شکننده‌تر می‌باشند، ممکن است به تریپسین کریستاله خالص شده نیاز بوده و لازم باشد که تا دمای ۴°C سرد شوند تا آسیب کاهش یابد. منابع دیگر پروتئاز در دسترس بوده تا از تماس سلول‌ها با محصولات حیوانی جلوگیری شود. تریپسین خوکی خالص شده ممکن است با تریپسین نوترکیب (TrypZean از شرکت Sigma و TrypLE™ از شرکت Invitrogen) جایگزین شود. همچنین پروتئازهای غیرپستانداران هم موجود می‌باشد (مثل Accutase™ یا Accumax™ از Sigma). پروناز، دیسپاز و کلاژناز، پروتئازهای باکتریایی بوده که با بازدارنده‌های تریپسین خنثی نمی‌شوند و ممکن است برای حذف آنها از سانتریفوژ استفاده شود. امکان غیرفعال‌سازی پروناز با رقیق کردن وجود دارد بدون اینکه نیازی به خنثی سازی آن در شرایط بدون سرم باشد. پروناز بسیار موثر است اما برای بعضی از سلول‌ها سمی است؛ دیسپاز و کلاژناز در صورت وجود سلول‌های اپی‌تلیال سوسپانسیون تک سلولی نخواهند داد.

هورمون‌ها

هورمون‌هایی که برای جایگزینی سرم استفاده می‌شوند شامل هورمون رشد (سوماتوتروپین) ۵۰ng/mL، انسولین با غلظت ۱۰-۱U/mL که کارایی پلیتینگ را در تعدادی از انواع سلول‌های مختلف افزایش می‌دهد و هیدروکورتیزون که کارایی کلونینگ سلول‌های گلیا و فیبروبلاست را زیاد کرده و برای نگهداری کراتینوسیت‌های اپیدرمی و تعداد دیگری از سلول‌های اپی تلیال دیگر لازم می‌باشد. Barnes و Sato نشان داده‌اند که ۱۰pM از تری یدوتیرونین (T_3) برای سلول‌های MDCK (کلیه سگ) به عنوان مکمل ضروری بوده و همچنین برای اپی تلیوم ریه هم استفاده شده است. مشخص شده است که ترکیبات مختلفی از استروژن، آندروژن یا پروژسترون با هیدروکورتیزون و پرولاکتین در حدود ۱۰nM، برای نگهداری اپی‌تلیوم پستان مورد نیاز می باشد.

مشخص شده است که هورمون‌های دیگر که دارای فعالیت‌هایی بوده که معمولاً وابسته به سلول می‌باشند مثل هورمون‌های تحریک کننده فولیکول (FSH) با ملانومای موشی B_{16} در جایگزینی سرم موثر می باشند. احتمال دارد که بین تعدادی از پلی‌پپتیدهای تحریک کننده رشد و هورمون‌های پپتیدی شناخته شده توالی‌های مشابه وجود داشته باشد. همچنین ممکن است فراوری تعدادی از پروتئین‌ها یا پلی‌پپتیدهای بزرگ، توالی‌های پپتیدی فعال با عملکردهای کاملاً متفاوت ایجاد کند.

فاکتورهای رشد

خانواده پلی پپتیدهایی که مشخص شده است در *in vitro* میتوژنیک می‌باشند، اکنون کاملاً گسترده بوده و شامل فاکتورهای رشد باند شونده به هپارین (شامل خانواده FGF)، EGF، PDGF، IGF-I و IGF-II و اینترلوکین‌ها می‌باشد که در محدوده ۱۰-۱ ng/mL فعال می‌باشند. فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها به جز آنهایی که در سیستم خونساز فعال می‌باشند، در دامنه وسیعی اختصاصی عمل می کنند. فاکتور رشد کراتینوسیت (KGF) علاوه بر نشان دادن فعالیت با کراتینوسیت‌های اپیدرمی، تکثیر و تمایز را در اپی تلیوم پروستات تحریک می‌کند. فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF) علاوه بر اینکه برای هپاتوسیت‌ها میتوژن بوده، برای توبول‌های کلیه مورفوژنیک می‌باشد. فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها به دلیل اینکه تولید آنها موضعی بوده و همچنین دامنهٔ محدودی دارند، اختصاصی عمل می‌کنند. اغلب آنها به صورت فاکتورهای پاراکراین عمل کرده (بر روی سلول‌های مجاور موثر بوده) و در گردش خون وارد نمی‌شوند.

فاکتورهای رشد ممکن است با همدیگر یا با هورمون‌های دیگر و فاکتورهای پاراکراین از قبیل پروستاگلاندین $F_{2\alpha}$ و هیدروکورتیزون به صورت هم افزاینده (synergistically) یا افزایشی (additively) عمل کنند. فعالیت اینترلوکین ۶ و انکواستاتین M بر روی سلول‌های A549 وابسته به دگزامتازون، یک مشابه هیدروکورتیزون سنتزی می‌باشد. فعالیت به دلیل تولید یک پروتئوگلیکان هپاران سولفات [heparan sulphate proteoglycan (HSPG)] می‌باشد. ابتدا نیاز به هپارین یا HSPG با FGF مشاهده شد، اما چون نشان داده شده است که β- گلیکان در پاسخ سلولی به TGF-β دخالت دارد، ممکن است این پدیده عمومی‌تر باشد. بعضی از فاکتورهای رشد قبل از عمل وابسته به فعالیت یک فاکتور رشد دوم می‌باشند، مثلاً بومبزین (bombesin) به تنهایی در سلول‌های معمولی میتوژن نمی‌باشد و به فعالیت قبلی و یا همزمان انسولین و یا یکی از IGFها نیاز دارد.

جدول ۳-۷: فاکتورهای رشد و عوامل میتوززا

Name and synonyms	Abbrevi-ation	Mol. mass. (KDa)	Source*	Function
Acidic fibroblast gf; aFGF; heparin binding gf 1, HBGF-1; endothelial cell gf (ECGF); myoblast gf (MGF)	FGF-1	13 h	Bovine brain; pituitary	Mitogen for endothelial cells
Activin; TGF-β family		g	Gonads	Morphogen; stimulates FSH secretion
Angiogenin		16	Fibroblasts, lymphocytes, colonic epithelial; cells	Angiogenic; endothelial mitogen
Astroglial growth factor-1; member of acidic FGFs	AGF-1	14	Brain	Mitogen for astroglia
Astroglial growth factor-2; member of basic FGFs	AGF-2	14	Brain	Mitogen for astroglia
Basic fibroblast gf; bFGF; HBGF-2; prostatropin	FGF-2	13 h	Bovine brain; pituitary	Mitogen for many mesodermal and neuroectodermal cells; adipocyte and ovarian granulosa cell differentiation
Brain-derived neurotrophic factor	BDNF	28	Brain	Neuronal viability
Cachectin	TNF-α	17	Monocytes	Catabolic; cachexia; shock
Cholera toxin	CT	80–90	Cholera bacillus	Mitogen for some normal epithelia
Ciliary neurotrophic factor; member of IL-6 group	CNTF		Eye	
Endothelial cell growth factor; acidic FGF family	ECGF	h	Recombinant	Endothelial mitogenesis
Endothelial growth supplement; mixture of endothelial mitogens	ECGS		Bovine pituitary	Endothelial mitogenesis
Endotoxin			Bacteria	Stimulates TNF production
Epidermal growth factor, Urogastrone	EGF	6	Submaxillary salivary gland (mouse) human urine; guinea pig prostate	Active transport; DNA, RNA, protein, synthesis; mitogen for epithelial and fibroblastic cells; synergizes with IGF-1 and TGF-β
Erythropoietin	EPO	34–39 g	Juxtaglomerular cells of kidney	Erythroid progenitor proliferation and differentiation
Eye-derived growth factor-1; member of basic FGFs	EDGF-1	14	Eye	
Eye-derived growth factor-2; member of acidic FGFs	EDGF-2	14	Eye	
Fibroblast gf-3; product of *int*-2 oncogene	FGF-3	14 h	Mammary tumors	Mitogen; morphogen; angiogenic
Fibroblast gf-4; product of *hst*/KS3 oncogene	FGF-4	14 h	Embryo; tumors	Mitogen; morphogen; angiogenic
Fibroblast gf-5	FGF-5	14 h	Fibroblasts; epithelial cells; tumors	Mitogen; morphogen; angiogenic
Fibroblast gf-6; product of *hst*-2 oncogene	FGF-6	14 h	Testis; heart; muscle	Mitogenic for fibroblasts; morphogen
Fibroblast gf-9	FGF-9	14 h	Recombinant	
Fibroblast gf-10	FGF-10	14 h		Trophoblast invasion; stimulate uPA and PAI-1; alveolar epithelial mitogen
Granulocyte colony-stimulating factor; pluripoietin; CFS-β	G-CSF	18–22		Granulocyte progenitor proliferation and differentiation

جدول ۳-۷: فاکتورهای رشد و عوامل میتوززا(ادامه)

Name and synonyms	Abbreviation	Mol. mass. (KDa)	Source*	Function
Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor CSA; human CSFα	GM-CSF	14–35 g		Granulocyte/macrophage progenitor proliferation
Heparin-binding EGF-like factor	HB-EGF		Recombinant	
Hepatocyte gf, HBGF-8; Scatter factor	HGF	h	Fibroblasts	Epithelial morphogenesis; hepatocyte proliferation
Heregulin; *erb*B2 ligand	HRG	70	Breast cancer cells; recombinant	Mammary and other epithelial cell mitogen
Immune interferon; macrophage-activating factor (MAF)	IFN-γ	20–25	Activated lymphocytes	Antiviral; activates macrophages
Inhibin; TGF-β family		31 g	Ovary	Morphogen; inhibits FSH secretion
Insulin	Ins	6	βIslet cells of pancreas	Glucose uptake and oxidation; amino acid uptake; glyconeogenesis
Insulin-like gf 1; somatomedin-C; NSILA-1	IGF-1			Mediates effect of growth hormone on cartilage sulfation; insulin-like activity
Insulin-like gf2; MSA in rat	IGF-2	7	BRL-3A cell-conditioned medium	Mediates effect of growth hormone on cartilage sulfation; insulin-like activity
Interferon-α1; leukocyte interferon	IFN-α1	18–20	Macrophages	Antiviral; differentiation inducer; anticancer
Interferon-α2; leukocyte interferon	IFN-α2	18–20	Macrophages	Antiviral; differentiation inducer; anticancer
Interferon-β; fibroblast interferon	IFN-β1	22–27 g	Fibroblasts	Antiviral; differentiation inducer; anticancer
Interferon β2; fibroblast interferon; IL-6, BSF-2 (*see also* IL-6)	IFN-β2	22–27 g	Activated T-cells; fibroblasts; tumor cells	Keratinocyte differentiation; PC12 differentiation (*see also* IL-6)
Interferon γ; immune interferon	IFNγ	Activated lympho-cytes	Antiviral, macrophage activator; antiproliferative on transformed cells	
Interleukin-1; lymphocyte-activating factor (LAF); B-cell-activating factor (BAF); hematopoietin-1	IL-1	12–18	Activated macrophages	Induces IL-2 release
Interleukin-2; T-cell gf (TCGF)	IL-2	15	CD4+ve lymphocytes (NK); murine LBRM-5A4 and human Jurkat FHCRC cell lines	Supports growth of activated T-cells; stimulates LAK cells
Interleukin-3; multipotential colony-stimulating factor; mast cell growth factor	IL-3	14–28 g	Activated T-cells; WEHI-3b myelomonocytic cell lines	Granulocyte/macrophage production and differentiation
Interleukin-4; B-cell gf; BCGF-1; BSF-1	IL-4	15–20	Activated CD4+ve lymphocytes	Competence factor for resulting B-cells; mast cell maturation (with IL-3)
Interleukin-5; T-cell-replacing factor (TRF); eosinophil-differentiating factor (EDF) BCGF-2	IL-5	12–18 g	T-lymphocytes	Eosinophil differentiation; progression factor for competent B-cells

جدول ۳-۷: فاکتورهای رشد و عوامل میتوززا(ادامه)

Name and synonyms	Abbreviation	Mol. mass. (KDa)	Source*	Function
Interleukin-6; Interferon β-2; B-cell-stimulating factor (BSF-2); hepatocyte-stimulating factor; hybridoma-plasmacytoma gf	IL-6	22–27 g	Activated T-cells macrophage/monocytes; fibroblasts; tumor cells	Acute phase response; B-cell differentiation; keratinocyte differentiation; PC12 differentiation
Interleukin-7; hematopoietic growth factor; lymphopoietin 1	IL-7	15–17 g	Bone marrow stroma	Pre- and pro-B-cell growth factor
Interleukin-8; monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF); T-cell chemotactic factor; neutrophil-activating protein (NAP-1)	IL-8	8–10 h	LPS monocytes; PHA lymphocytes; endothelial cells; IL-1- and TNF-stimulated fibroblasts and keratinocytes	Chemotactic factor for neutrophils, basophils, and T-cells
Interleukin-9; human P-40; mouse T-helper gf; mast-cell-enhancing activity (MEA)	IL-9	30–40	CD4+ve T-cells; stimulated by anti-CD4 antibody PHA or PMA	Growth factor for T-helper, megakaryocytes, mast cells (with IL-3)
Interleukin-10; cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)	IL-10	20		Immune suppressor
Interleukin-11; adipogenesis inhibitory factor (AGIF)	IL-11	21		Stimulates plasmacytoma proliferation and T-cell-dependent development of Ig-producing B-cells
Interleukin-12; cytotoxic lymphocyte maturation factor	IL-12	40, 35 subunits		Activated T-cell and NK cell growth factor; induces IFN-γ
Keratinocyte gf, FGF-7	KGF	14 h	Fibroblasts	Keratinocyte proliferation and differentiation; prostate epithelial proliferation and differentiation
Leukemia inhibitory factor; HILDA; member of IL-6 group	LIF	24	SCO cells	Inhibits differentiation in embryonal stem cells
Lipopolysaccharide	LPS	10	Gram-positive bacteria	Lymphocyte activation
Lymphotoxin	TNF-β	20–25	Lymphocytes	Cytotoxic for tumor cells
Macrophage inflammatory protein−1α	MIP−1α	10	Macrophages	Hematopoietic stem cell inhibitor
Monocyte/macrophage colony-stimulating factor CSF-1	M-CSF	47–74	B- and T-cells, monocytes, mast cells, fibroblasts	Macrophage progenitor proliferation and differentiation
Müllerian inhibition factor	MIF		Testis	Inhibition of Müllerian duct; inhibition of ovarian carcinoma
Nerve gf, β	βNGF	27	Male mouse submaxillary salivary gland	Trophic factor; chemotactic factor; differentiation factor; neurite outgrowth in peripheral nerve
Oncostatin M; member of IL-6 group	OSM	28	Activated T-cells and PMA-treated monocytes	Differentiation inducer (with glucocorticoid); fibroblast mitogen
Phytohemagglutinin	PHA	30	Red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)	Lymphocyte activation
Platelet-derived endothelial cell growth factor; similar to gliostatin	PD-ECGF	~70	Blood platelets, fibroblasts, smooth muscle	Angiogenesis; endothelial cell mitogen; neuronal viability; glial cytostasis

جدول ۳–۷: فاکتورهای رشد و عوامل میتوززا(ادامه)

Name and synonyms	Abbreviation	Mol. mass. (KDa)	Source*	Function
Platelet-derived growth factor	PDGF	30	Blood platelets	Mitogen for mesodermal and neuroectodermal cells; wound repair; synergizes with EGF and IGF-1
Phorbol myristate acetate; TPA; phorbol ester	PMA	0.617	Croton oil	Tumor promoter; mitogen for some epithelial cells and melanocytes; differentiation factor for HL-60 and squamous epithelium
Pokeweed mitogen	PWM		Roots of pokeweed (*Phytolacca americana*)	Monocyte activation
Stem cell factor; mast cell growth factor; steel factor; *c-kit* ligand	SCF	31 g	Endothelial cells, fibroblasts, bone marrow, Sertoli cells	Promotes first maturation division of pluripotent hematopoietic stem cell
Transferrin	Tfn	78	Liver	Iron transport; mitogen
Transforming growth factor α	TGF-α	6		Induces anchorage-independent growth and loss of contact inhibition
Transforming growth factor β (six species)	TGF-β1–6	23–25 dimer	Blood platelets	Epithelial cell proliferation inhibitor; squamous differentiation inducer

مواد مغذی سرم

در دستور کارهای بدون سرم، آهن، مس و تعدادی از مواد معدنی وجود دارد، هر چند هنوز در مورد اینکه مواد معدنی کمیاب‌تر مورد نیاز می‌باشند، شواهدی وجود ندارد. سلنیوم (Na_2SeO_3) به مقدار حدود ۲۰nM در اغلب فرمول‌ها وجود دارد و به نظر می‌رسد برای چربی‌ها و یا پیش‌سازهای چربی از قبیل کولین، لینولئیک اسید، اتانول آمین یا فسفواتانول آمین مورد نیاز باشد.

پروتئین‌ها و پلی‌آمین‌ها

وجود پروتئین‌هایی از قبیل آلبومین سرم گاوی (BSA) یا عصاره‌های بافتی در محیط کشت، اغلب، رشد سلولی و بقاء را افزایش می‌دهد، اما مواد تشکیل دهنده نامشخص را به محیط کشت اضافه می‌کند. عصاره های بافتی از قبیل عصاره هیپوفیز گاو در محیط های کشت بدون سرم کراتینوسیت بکار می رود اما می توان بعضی از فاکتورهای رشد نوترکیب شناخته شده را جایگزین آنها کرد. BSA فاقد اسید چرب با غلظت ۱-۱۰mg/mL استفاده می‌شود. ترانسفرین با غلظت حدود ۱۰ng/mL به عنوان حامل آهن مورد نیاز بوده و همچنین ممکن است یک نقش میتوزی داشته باشد. پوترسین در غلظت ۱۰۰nM استفاده می‌شود.

ماتریکس

یکی از ویژگی‌های سرم، فراهم‌سازی تعدادی از پروتئین‌ها از قبیل فیبرونکتین می‌باشد که پلاستیک را پوشانده و آن را چسبنده‌تر می‌کند. در غیاب سرم ممکن است بستر پلاستیکی با فیبرونکتین یا پلی‌لیزین پوشیده شود.

انتخاب محیط کشت بدون سرم

اگر دلیل استفاده از یک محیط کشت بدون سرم، افزایش رشد انتخابی یک نوع سلول خاص باشد، بنابراین این دلیل تعیین کننده نوع محیط کشت می‌باشد (مثلاً MCDB 153 برای کراتینوسیت‌های اپیدرمی، LHC-9 برای اپی‌تلیوم برونش، HITES برای سرطان ریه small-cell ، MCDB 130 برای آندوتلیوم و غیره). اگر دلیل استفاده از محیط کشت بدون سرم فقط به خاطر اجتناب از مصرف سرم با رده‌های سلولی پیوسته از قبیل سلول‌های CHO یا هیبریدوماها به منظور کاهش احتمال حضور پروتئین‌های ویروسی یا سرمی در محصول سلولی باشد، انتخاب وسیع‌تر می‌باشد. وقتی یک رده سلولی از یک مرکز یا بانک سلولی معتبر فراهم شود، فروشنده، محیط کشت مناسب را پیشنهاد خواهد کرد و تنها دلیل برای تغییر محیط کشت زمانی لازم است که محیط کشت در دسترس نبوده یا با استوک‌های دیگر ناسازگار باشد. در صورت امکان بهتر است که محیط کشت مطابق با توصیه مرکز فراهم کننده رده سلولی باشد، چون ممکن است اینکار تنها راه برای اطمینان از این باشد که رده سلولی ویژگی‌های اختصاصی خود را بروز می‌دهد.

محیط‌های کشت بدون سرم تجاری موجود

در حال حاضر، چند شرکت محیط‌های کشت بدون سرم را می‌سازند. تعدادی از این محیط‌های کشت از قبیل

MCDB 131 برای سلول‌های اندوتلیال و LHC-9 برای اپی تلیوم برونش دارای فرمولاسیون تعریف شده می‌باشند، در حالی که بقیه محیط‌های کشت مثل CHO-S-SFM برای سلول‌های CHO-K1 وOpti-MEM برای سلول‌های خونساز، فرمول‌های اختصاصی دارند. تعدادی از محیط‌های کشت برای کشت هیبریدوماها زمانی که تشکیل محصول عاری از پروتئین‌های سرمی اهمیت دارد ساخته شده‌اند اما بقیه محیط‌های کشت برای انواع سلول‌های دیگر قابل استفاده می‌باشد. در حالی که در مقالات مواردی از استفاده محیط‌های کشت اختصاصی برای انواع سلول‌های اختصاصی وجود دارد، اغلب دستورالعمل‌های تجاری به صورت محرمانه بوده و شما فقط می‌توانید به پیشنهاد شرکت سازنده اعتماد کرده و یا بهتر است که تعدادی از محیط‌های کشت را طی چندین واکشت با سلول‌های خودتان غربال کنید. مورد دوم می‌تواند یک روش پرهزینه باشد اما اگر شما قصد دارید که به صورت طولانی مدت با سلول کار کنید، قابل توجیه می‌باشد.

تشخیص کنترل کیفیت که توسط تولید کنندگان تجاری محیط‌های کشت بدون سرم انجام می‌شود، مهم می‌باشد. حالت ایده آل این است که محیط‌های کشت با سلول‌هایی که شما قصد رشد آنها را دارید، آزمایش شوند (مثلاً محیط کشت رشد کراتینوسیت باید بر روی کراتینوسیت‌ها آزمایش شود). بعضی از شرکت‌های سازنده مثلCambrex، Cascade و PromoCell، محیط کشت را با سلول‌های مناسب تست می‌کنند که باعث اطمینان از کنترل کیفیت صحیح می‌باشد اما ممکن است بقیه شرکت‌ها عمل کنترل کیفیت را با رده‌های سلولی روتین انجام دهند که در این مورد باید شما کنترل کیفیت مربوط به خودتان را قبل از خریداری محیط کشت، انجام دهید.

جایگزین‌های سرم

تعدادی از محصولات برای جایگزینی همه یا قسمتی از سرم در محیط‌های کشت معمول به وجود آمده است. تعدادی از این محصولات شامل(Bayer) Ex-cyte، CPSR-Ventrex(JRH Biosciences)، 1,2,3(Sigma)، Nu-serum (Becton Dickinson) و Biotain-MPS (Cambrex) می‌باشد. در حالی که این محصولات ممکن است درجه‌ای از ثبات را فراهم سازند که در سرم‌های معمول وجود ندارد، هنوز تغییر در بچ‌ها می‌تواند رخ داده و اجزای تشکیل دهنده محصولات به صورت کامل مشخص نشده‌اند. آنها ممکن است به عنوان یک مقیاس برای یک مقصود خاص یا برای مقاصد تجاری مفید باشند، اما جایگزین محیط‌های کشت بدون سرم نمی‌باشند. Nutridoma (BCL)، ITS Premix، TCM، TCH(ICN)، SIT(Sigma)، Excell-900 (JRH Biosciences) مکمل‌های تعریف شده‌ای بوده که در جایگزینی سرم به صورت کامل یا جزئی کمک می‌کنند.

اکنون انتخاب محیط‌های کشت بدون سرم و جایگزین‌های سرم به قدری وسیع می‌باشد که امکان ندارد برای کارهای مشخص، توصیه‌های اختصاصی ارائه کرد. بهترین روش، چک کردن مقالات، تماس با شرکت‌های سازنده و تهیه محصولاتی که با توجه به مقالات موجود مناسب‌تر بوده و غربالگری محصولات در آزمون‌های خودتان می‌باشد(مثلاً برای رشد، بقاء یا فعالیت‌های اختصاصی).

سازگاری به محیط کشت بدون سرم

بسیاری از رده های سلولی پیوسته از قبیل HeLa، CHO- K1 یا میلوماهای موشی ممکن است به رشد در غیاب سرم سازگار شوند. این کار شامل یک دوره طولانی از انتخاب یک جزء کوچک از جمعیت سلولی می باشد، بنابراین مهم است که اطمینان حاصل شود که ویژگیهای رده سلولی در طی این دوره از انتخاب از دست نرفته باشد. اگر یک میلوما برای تهیه یک هیبریدوما و یا یک سلول CHO برای ترانسفکشن استفاده شده باشد، باید قبل از آمیختن یا ترانسفکشن، یک رده بدون سرم انتخاب شود تا خطر از دست رفتن ویژگیها در طی انتخاب به حداقل برسد.

معمولاً سازگاری به محیط کشت بدون سرم در طی چندین واکشت پشت سر هم انجام می شود و غلظت سرم به تدریج کاهش می یابد. وقتی که تکثیر سلولی پایدار در یک غلظت رخ داد، سلولها را در یک غلظت پایین تر واکشت داده تا زمانیکه مجدداً رشد پایدار حاصل شود سپس دوباره سرم رقیق می شود. در کشت های سوسپانسیون این کار با مانیتورینگ تعداد سلولهای زیستا و بر اساس آن رقیق کردن سوسپانسیون سلولی انجام می گیرد که شاید غلظت سلولی حداقل را بالاتر از واکشت معمولی نگه دارد. برای کشت های تک لایه، غلظت سرم را چند روز قبل از واکشت کاهش دهید و سپس در غلظت پایین و جدید سرم واکشت دهید. در طی فرایند سازگاری ممکن است لازم باشد که محیط کشت برای جایگزینی سرم با فاکتورهای شناخته شده تکمیل شود.

تکامل محیط‌های کشت بدون سرم

دو روش اصولی برای تکامل یک محیط کشت بدون سرم برای یک رده سلولی خاص و یا کشت اولیه وجود دارد. اولین

جدول ۴–۷: انتخاب یک محیط کشت فاقد سرم

Cells or cell line	Serum-free medium (*see* Table 10.1)	Refs. (*see* Tables 10.1 and 10.2)	Commercial suppliers (of specified media or alternatives)
Adipocytes		Rodriguez et al., 2004	PromoCell
BHK 21	HyQ PF CHO; HyG PF CHO MPS; PC-1	Pardee et al., 1984	Cambrex
Bronchial epithelium	LHC-9	*See* Protocol 22.9	Biosource; Cambrex; PromoCell
Chick embryo fibroblasts	MCDB 201, 202	McKeehan & Ham, 1976b	Sigma
Chinese hamster ovary (CHO)	MCDB 302; PC-1	Hamilton & Ham, 1977	Cambrex; Sigma; Invitrogen; JRH Biosciences; PromoCell
Chondrocytes	Supplemented DMEM/F12	Adolphe, 1984; *see* Protocol 23.13	PromoCell
Continuous cell lines	Eagle's MEM, M199, MB752/1, CMRL 1066, MCDB media, DMEM:F12 + supplements	Waymouth, 1984	Cambrex; Invitrogen; JRH Biosciences; ICN; Sigma
Corneal epithelial cells	MCDB 153	*See* Protocol 23.2	Cambrex, KGM; Cascade
COS-1,7		Doering et al., 2002	Cambrex
Endothelium	MCDB 130, 131	Knedler & Ham, 1987; Gupta et al., 1997; Hoheisel et al., 1998	Cambrex; Cascade; PromoCell; Sigma
Fibroblasts	MCDB 110, 202, 402	Bettger et al., 1981; Shipley & Ham, 1983	Cambrex; Cascade; PromoCell; Sigma
Glial cells	Michler-Stuke	Michler-Stuke & Bottenstein, 1982	Cambrex; Invitrogen
Glioma	SF12 (Ham's F12 with extra essential and nonessential amino acids)	Frame et al., 1980; Freshney, 1980	Cambrex; Invitrogen
HeLa cells		Blaker et al., 1971; Bertheussen, 1993	Cambrex
Hematopoietic cells	αMEM; Iscove's	Stanners et al., 1971; Iscove & Melchers, 1978	Sigma; Roche
HL-60		Li et al., 1997	Cambrex
HT-29		Oh et al., 2001	Cambrex
Human diploid fibroblasts	MCDB 110, 202; PC-1	Bettger et al., 1981; Ham, 1984	Cascade; Cambrex; PromoCell
Human leukemia and normal leukocytes	Iscove's	Breitman et al., 1984	Cambrex; Hyclone; MP Biomedicals Invitrogen; JRH Biosciences; Sigma
Human tumors	Brower; HITES; Masui; Bottenstein N3	Brower et al., 1986; Carney et al., 1981; Masui et al., 1986b; Bottenstein, 1984; Chopra et al., 1996	
Hepatocytes, liver epithelium	Williams E, L15	Williams & Gunn, 1974; Mitaka et al., 1993]	Cambrex; Sigma
Hybridomas	Iscove's	Iscove & Melchers, 1978; Murakami, 1984	Sigma; Invitrogen; Cambrex; JRH Biosciences; MP Biomedicals; Roche; Irvine Scientific; Metachem; PromoCell
Insect cells		Ikonomou et al., 2003	JRH Biosciences; Cell Gro

جدول ۴-۷: انتخاب یک محیط کشت فاقد سرم(ادامه)

Cells or cell line	Serum-free medium (*see* Table 10.1)	Refs. (*see* Tables 10.1 and 10.2)	Commercial suppliers (of specified media or alternatives)
Keratinocytes	MCDB 153	Peehl & Ham, 1980; Tsao et al., 1982; Boyce & Ham, 1983; *see* Protocol 23.1	Invitrogen; Cascade; Cambrex; PromoCell; Sigma
L cells (L929, LS)	NCTC109; NCTC135	Birch & Pirt, 1970, 1971; Higuchi, 1977	Sigma
Lymphoblastoid cell lines (human)	Iscove's	Iscove & Melchers, 1978	JRH Biosciences; CellGenix; Amersham
Mammary epithelium	MCDB 170	Hammond et al., 1984; *see* Protocol 22.3	Cascade; Cambrex
MDCK dog kidney epithelium	K-1; PC-1	Taub, 1984	Cambrex
LLC-PK, pig kidney	K-2	Taub, 1984	
Melanocytes	Gilchrest	*See* Protocol 22.18	Cambrex; Cascade; PromoCell
Melanoma	Gilchrest	*See* Protocol 22.18; Halaban, 2004	Cambrex; Cascade; PromoCell
Mouse embryo fibroblasts; 3T3 cells	MCDB 402	Shipley & Ham, 1983; Ham, 1984	Biosource
Mouse leukemia		Murakami, 1984	
Mouse erythroleukemia	SF12 (Ham's F12 with extra essential and nonessential amino acids); Iscove's	Frame et al., 1980; Freshney, 1980; Iscove & Melchers, 1978	MP Biomedicals; Invitrogen; Sigma
Mouse myeloma		Murakami, 1984	Sigma, Invitrogen
Mouse neuroblastoma	MCDB 411; DMEM:F12/N1	Agy et al., 1981; Bottenstein, 1984	
Neurons	DMEM:F12/N3; B27/Neurobasal	Bottenstein, 1984; Brewer, 1995	N2, Invitrogen
Osteoblasts		Shiga et al., 2003	OGM, Cambrex; PromoCell
Prostate	WJAC 404;	*See* Table 10.11; Peehl, 2002	Cambrex
Renal			REGM (epithelial) MsGM (mesangial), Cambrex
Smooth muscle cells			Cascade; Cambrex; PromoCell
Skeletal myoblasts		Goto et al., 1999	PromoCell
Urothelium	MCDB 153; KSFMc	Southgate et al., 2002	KGM-2, Cambrex
Matrix-coating products			B-D Biosciences; MP Biomedicals; Invitrogen; Biosource; Sigma

روش اتخاذ یک دستورالعمل مشخص برای یک نوع سلول مربوطه، با ٪۲۰-۱۰ سرم دیالیز شده یا بدون سرم و تغییر اجزاء تشکیل دهنده به صورت تکی یا گروهی می باشد، در حالی که میزان سرم را کاهش می‌دهیم، تا اینکه محیط کشت برای نیاز خاص شما بهینه شود. این روش توسط Ham و همکارانش استفاده شده است و به طور کلی شرایط بهینه را فراهم خواهد ساخت. اگر مشخص شود که یک گروه از ترکیبات در کاهش دادن مکمل سازی با سرم موثر می‌باشد، ممکن است با حذف منظم اجزاء سازنده منفرد، اجزاء تشکیل دهنده فعال تشخیص داده شده و سپس غلظت‌های اجزاء تشکیل دهنده ضروری بهینه شود. هر چند این منحنی‌های رشد و آزمون‌های رشد کلونال در هر مرحله، یک فرایند بسیار وقت‌گیر و پر زحمت بوده و انتظار اینکه برای تکامل یک محیط کشت جدید برای یک نوع سلول جدید سه سال صرف شود، غیرمعقول نمی‌باشد.

ماهیت وقت‌گیر روش اول باعث استفاده از روش دوم شد. در این روش محیط‌های کشت موجود از قبیل RPMI 1640 یا محیط‌های کشت ترکیبی از قبیل Ham's F12 یا DMEM تکمیل شده و دستکاری اجزاء تشکیل دهنده به مواد کمتر

محدود می‌شود. از جمله مواد اخیر می‌توان سلنیوم، ترانسفرین، آلبومین، انسولین، هیدروکورتیزون، استروژن، تری یدوتیرونین اتانول آمین، فسفواتانول آمین، فاکتورهای رشد (EGF، FGF، PDGF، مکمل رشد اندوتلیال و غیره)، پروستاگلاندین‌ها (PGE_1، $PGE_{2\alpha}$) و هر نوع مواد دیگری که ممکن است رابطه خاصی داشته باشد را نام برد. معمولاً مشخص شده است که سلنیوم، ترانسفرین و انسولین برای اغلب سلول‌ها ضروری می‌باشد در حالی که نیاز به مواد دیگر بیشتر متغیر خواهد بود.

آماده سازی محیط کشت بدون سرم

در حال حاضر دستورالعمل‌هایی برای محیط‌های کشت بدون سرم موجود می‌باشد که تعدادی از آنها برای انواع سلول‌های خاص به صورت تجاری می‌باشد. روش ساختن محیط‌های کشت بدون سرم مشابه با محیط‌های کشت معمول می‌باشد. باید آب و معرف‌های بسیار خالص استفاده شود و باید مراقب بود تا از رسوب محلول‌های Ca^{2+}، Fe^{2+} یا Fe^{3+} جلوگیری شود. نمک‌های فلزی در pH قلیایی در حضور فسفات، به خصوص وقتی که محیط کشت یا محلول نمکی اتوکلاو می‌شود، رسوب می‌کنند، بنابراین باید در محلول استوک کاتیون‌ها در pH پایین (زیر ۶/۵) نگه داشته شده و بدون فسفات نگهداری شوند. آنها را باید توسط اتوکلاو کردن یا فیلتراسیون استریل کرد. اغلب توصیه می‌شود که کاتیون‌ها در آخر بلافاصله قبل از استفاده از محیط کشت اضافه شوند. در غیر این صورت مواد تشکیل دهنده، عموماً به صورت یک سری محلول استوک ساخته می‌شوند. مواد معدنی و ویتامین‌ها ×۱۰۰۰، تیروزین، تریپتوفان و فنیل آلانین در ۰/۱N HCl در ×۵۰، اسیدهای آمینه ضروری ×۱۰۰ در آب، نمک‌ها ×۱۰ در آب و هرگونه کوفاکتور خاص دیگر، لیپیدها و غیره ×۱۰۰۰ در حلال مناسب تهیه می‌شوند. آنها را با نسبت‌های صحیح با هم مخلوط کرده و تا غلظت نهایی رقیق کرده و سپس pH و اسمولالیتی چک می‌شود.

بهتر است که فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و فاکتورهای اتصال سلولی به صورت جداگانه درست قبل از استفاده از محیط کشت اضافه شوند، چون ممکن است لازم باشد که برای وفق در شرایط آزمایشگاهی خاص تنظیم شوند.

محیط‌های کشت فاقد پروتئین

فشار فزاینده‌ای برای حذف تماس تمام محصولات حیوانی با سلول‌های کشت داده شده مورد استفاده در تولید مواد زیست دارویی وجود دارد. می‌توان به جای تریپسین از تریپسین نوترکیب یا پروتئاز مربوط به یک جاندار بی‌مهره استفاده کرد و فاکتورهای رشد را با فاکتورهای رشد نوترکیب جایگزین کرد. BSA را می‌توان اغلب با مکمل‌سازی توسط عواملی از قبیل لیپیدها، هورمون‌ها، مواد معدنی و فاکتورهای رشد که به طور طبیعی در سرم به BSA متصل می‌شوند، جایگزین کرد. سازگاری به محیط کشت فاقد پروتئین ممکن است نیازمند انتخاب بیشتری باشد.

نتیجه

هر چند ممکن است شرایط بدون سرم مطلوب باشد ولی بی تردید هرگز سادگی نسبی محیط‌های کشت دارای سرم را نداشته و تکنیک‌های خاص مورد نیاز برای استفاده تعدادی از محیط‌های کشت بدون سرم، وقت گیر بوده و تلاش‌ها و منابعی که برای آماده‌سازی دستورالعمل‌های جدید و یا حتی سازگار کردن دستورالعمل‌های موجود صرف می‌شود و لزوم استفاده از چند محیط کشت در صورتیکه با بیش از یک نوع سلول کار شود به عنوان موانع قابل توجه در استفاده از محیط‌های کشت بدون سرم در اغلب آزمایشگاهها می‌باشد. همچنین بدون شک، به دلیل نیاز به شرایط ثابت و مشخص برای بررسی فرایندهای تنظیمی کنترل کننده رشد و تمایز، فشار بیوتکنولوژی برای ساده تر کردن خالص‌سازی محصولات و نیاز به حذف تمام منابع بالقوه عفونت، درنهایت استفاده از محیط‌های کشت بدون سرم را در یک مقیاس عمومی‌تر تحمیل می‌کند.

فصل هشتم

آماده سازی و استریلیزاسیون

آماده سازی معرفها و مواد

همه استوک‌های مواد شیمیایی و شیشه آلات مورد استفاده در کشت بافت باید فقط برای همین منظور به کار برده شوند. حذف مقادیر اندک فلزات سنگین یا مواد سمی دیگر مشکل بوده و فقط با زوال تدریجی کشت قابل آشکارسازی می‌باشد. هر چند که معمولاً ظروف بکار رفته در کشت بافت کمتر کثیف می شوند اما شستشوی ظروف شیشه‌ای نیاز به دقت بیشتری دارد و ممکن است به یک دترژنت خاص نیاز باشد و باید از آلودگی عرضی با ظروف شیشه‌ای مربوط به مواد شیمیایی اجتناب شود. چون اکثر آزمایشگاهها، سلولها را در فلاسک‌های پلاستیکی یکبار مصرف تکثیر می‌کنند، تاثیر بر روی رشد تک لایه‌های چسبنده یک مسئله کم اهمیت می‌باشد، با وجود این هر زمان که از شیشه برای ذخیره یا کشت استفاده می‌شود، مسئله آلوده کننده‌های شیمیایی در داخل محیط‌های کشت یا معرف‌ها، باقی مانده و بنابراین پاکیزگی مطلق ضروری می‌باشد.

وسایل

شیشه آلات

در صورتیکه برای تکثیر سلولی از سطوح شیشه‌ای استفاده شود، نه تنها باید این سطوح تمیز باشند بلکه همچنین باید دارای بار مناسب هم باشند. دترژنت‌های بازی سوزآور، سطح شیشه را برای اتصال سلولی نامناسب کرده و بنابراین باید آن را با HCl یا H_2SO_4 رقیق خنثی کرد، اما دترژنت‌های خنثی سطح شیشه را تغییر نداده و می‌توان به طور کامل آنها را برطرف کرد. موثرترین روش شستشو به صورت زیر می‌باشد:

۱) اجازه ندهید که ظروف شیشه‌ای کثیف خشک شوند. باید یک عامل استریل کننده، مثل هیپوکلریت سدیم در آب برای جمع آوری ظروف شیشه‌ای آلوده وجود داشته باشد.

a) برای رفع هر نوع مخاطره زیستی بالقوه و

b) برای جلوگیری از رشد میکروب‌ها در آب

۲) از دترژنتی استفاده کنید که در آب منطقه شما موثر بوده، به راحتی شستشو شده و غیرسمی باشد(به انتخاب دترژنت در این فصل رجوع شود).

۳) قبل از خشک کردن ظروف شیشه‌ای مطمئن شوید که به طور کامل در آب شیر و آب دیونیزه یا آب مقطر، آبکشی شده است.

۴) ظروف شیشه‌ای را وارونه قرار دهید تا به آسانی خشک شوند.

۵) ظروف شیشه‌ای را با حرارت خشک استریل کرده تا خطر ته نشست پس مانده‌های سمی حاصل از استریلیزاسیون با بخار به حداقل برسد.

روشهای استریلیزاسیون نه تنها برای کشتن میکروارگانیسم‌های در حال تکثیر، بلکه همچنین برای حذف اسپورهای مقاوم نیز استفاده می شود. حرارت مرطوب موثرتر از حرارت خشک می‌باشد، هر چند که ممکن است خطر باقی ماندن پس مانده‌های سمی وجود داشته باشد. حرارت خشک ترجیح داده می‌شود اما دمای حداقل ۱۶۰°C به مدت یک ساعت مورد نیاز می‌باشد. حرارت مرطوب برای مایعات و مواد فاسد شدنی باید ۱۲۱°C به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه باشد. برای اینکه حرارت مرطوب موثر باشد، باید قبل از تزریق بخار به محفظه استریلیزاسیون این محفظه تخلیه شود یا باید هوا با جایگزینی رو به پایین با بخار کاملاً جایگزین شود.

جدول ۱-۸: روشهای استریلیزاسیون

Method	Conditions	Materials	Limitations
Dry heat	160°C, 1 h	Heat stable: metals, glass, PTFE.	Some charring may occur, e.g., of indicating tape and cotton plugs.
Moist heat	121°C, 15–20 min	Heat-stable liquids: water, salt solutions, autoclavable media. Moderately heat-stable plastics: silicones, polycarbonate, nylon, polypropylene.	Steam penetration requires steam-permeable packaging. Large fluid loads need time to heat up.
Irradiation:			
γ-Irradiation	25 kGy	Plastics, organic scaffolds, heat-sensitive reagents and pharmaceuticals.	Chemical alteration of plastics can occur. Macromolecular degradation.
Electron beam	25 kGy	Plastics, organic scaffolds, heat-sensitive reagents and pharmaceuticals.	Needs high-energy source. Not suitable for average laboratory installation.
Microwave	5 min full power	Aqueous solutions and gels such as agar.	Only useful for small volumes; usually just for melting agar
Short-wave UV	254 nM, 50–100 W, 30 min	Flat surfaces, circulating air.	Will not reach shadow areas. Spores resistant.
Chemical:			
Ethylene oxide	1 h	Heat-labile plastics.	Items must be ventilated for 24–48 h; leaves toxic residue.
Hypochlorite	300–2500 ppm 30 min	Contaminated solutions. Plastics.	Needs extensive washing. May leave residue.
70% Alcohol	Soak for 1 h	Dissecting instruments (combined with flaming). Some plastics.	Does not kill spores. Fire risk with flaming. Precast Perspex or Lucite may shatter if immersed in alcohol.
Filtration	0.1- to 0.2-µm porosity	All aqueous solutions; particularly suitable for heat-labile reagents and media. Specify low protein binding for growth factors, etc.	Not suitable for some solvents, e.g., DMSO. Slow with viscous solutions.

دستور کار۱-۸ - آماده سازی و استریل کردن ظروف شیشه‌ای

مواد

ماده ضدعفونی کننده: هیپوکلریت وقتی در دترژنت رقیق می‌شود حداقل دارای ۳۰۰ ppm کلر باشد (مثل قرصهای Clorox، Precept یا Chloros)

دترژنت (مثل 7x™ یا Decon®)

وان برای خیساندن ظروف

برس‌های شستشو مخصوص بطری

سبدهای از جنس فولاد ضد زنگ (برای جمع آوری ظروف شیشه‌ای شستشو داده شده تا خشک شوند)

فویل آلومینیومی

معرفهای استریلیتی (Alfa Medical برای حرارت خشک یا استریلیزاسیون با بخار، معرفهای Thermalog فقط برای استریلیزاسیون با بخار)

نوار یا برگه‌های نشان دهنده حالت استریل (Bennet) . چون درجه حرارت استریلیزاسیون در آون بالاتر از اتوکلاو می‌باشد، این نشانگرها یا نوارهای نشاندهنده استریل بودن در اتوکلاو فرق می‌کنند. اکثر نوارهای اتوکلاو نیم سوزشده و

مقادیر کمی مواد فرار آزاد کرده که می‌تواند روی آون و یا حتی ظروف شیشه‌ای ته نشین شود.

آون استریلیزاسیون که می‌تواند تا دمای ۱۶۰°C برسد و ترجیحاً دارای دماسنج ثبت کننده و میله کاوشگر انعطاف پذیر (flexible probe) باشد

دستور کار

جمع آوری و شستشوی ظروف شیشه‌ای:

۱- بلافاصله پس از استفاده، ظروف شیشه‌ای را در دترژنت حاوی ضدعفونی کننده جمع آوری کنید. مهم است که ظروف شیشه‌ای قبل از جمع آوری خشک نشوند زیرا در غیر اینصورت تمیز کردن آنها بسیار مشکلتر خواهد بود.

۲- به مدت یک شب در دترژنت بخیسانید.

۳- شستشو:

a) صبح روز بعد ظروف شیشه‌ای را با یک برس به صورت دستی یا با ماشین مخصوص برس کنید، و چهار بار با آب شیر و سپس سه مرتبه با آب دیونیزه آبکشی کنید. چیدن بطری‌ها در یک سبد به سریع انجام دادن این مرحله کمک خواهد کرد.

جدول ۲-۸: استریلیزاسیون وسایل و تجهیزات

Item	Sterilization
Ampoules for freezer, glass	Dry heat[1]
Ampoules for freezer, plastic	Autoclave[2] (usually bought sterile)
Apparatus containing glass and silicone tubing	Autoclave
Disposable tips for micropipettes	Autoclave in autoclavable trays or nylon bags
Filters, reusable	Autoclave; do not use prevacuum or postvacuum
Glassware	Dry heat
Glass bottles with screw caps	Autoclave with cap slack
Glass coverslips	Dry heat
Glass slides	Dry heat
Glass syringes	Autoclave (separate piston if PTFE)
Instruments	Dry heat
Magnetic stirrer bars	Autoclave
Pasteur pipettes, glass	Dry heat
Pipettes, glass	Dry heat
Plexiglas, Perspex, Lucite	70% EtOH (*see* text)
Polycarbonate	Autoclave
Repeating pipettes or syringes	Autoclave (separate PTFE pistons from glass barrels)
Screw caps	Autoclave
Silicone grease (for isolating clones)	Autoclave in glass Petri dish
Silicone tubing	Autoclave
Stoppers, rubber and silicone	Autoclave
Test tubes	Dry heat

[1]Dry heat, 160°C/L h.
[2]Autoclave, 100 kPa (1 bar, 15 lb/in.[2]), 121°C for 20 min.

b) آبکشی بوسیله ماشین باید بدون استفاده از دترژنت صورت پذیرد.

۴- بعد از آبکشی کامل، ظروف را در یک سبد سیمی از جنس فولاد ضدزنگ به حالت وارونه قرار داده و اجازه دهید که خشک شوند.

۵- در بطریها را با فویل آلومینیومی بپوشانید.

استریلیزاسیون ظروف شیشه ای:

۱- تکه‌های مربع شکل کوچکی از نوار چسب نشانگر استریل بودن را به ظروف شیشه‌ای چسبانده و روی آن تاریخ را یادداشت کنید.

۲- ظروف شیشه‌ای را در یک آون مجهز به فن سرکوله کننده هوا قرار داده و درجه حرارت را در ۱۶۰°C تنظیم کنید.

۳- برای اطمینان از اینکه مرکز بار به دمای ۱۶۰°C می‌رسد:

a) یک نشانگر استریلتی را در یک بطری در وسط بار قرار دهید.

b) در صورتیکه از دماسنج ثبت کننده استفاده می‌شود، سنسور را در یک بطری در وسط بار قرار دهید.

c) وسایل را به صورت خیلی تنگ قرار ندهید و فضاهایی را برای جریان هوای گرم باقی گذارید.

۴- در آون را ببندید، چک کنید که حرارت تا ۱۶۰°C برسد، قطعه باریکی از نوار که زمان بر روی آن یادداشت شده است را بر روی آون چسبانیده و به مدت یک ساعت صبر کنید.

۵- پس از مدت یک ساعت، آون را خاموش کرده و اجازه دهید در همان حال که در آون بسته می باشد، سرد شود. بهتر است که آون را روی زمان سنج خودکار قرار داده تا پس از مدت مورد نظر خاموشی شود.

۶- ظروف شیشه‌ای را در عرض ۴۸-۲۴ ساعت استفاده کنید.

مواد آلی را دور از آون نگه دارید. از نوار کاغذی یا مواد بسته‌بندی استفاده نکنید مگر اینکه مطمئن باشید که در هنگام گرم شدن، محصولات فرار تولید نمی‌کنند. همچنین می‌توان در بطری را توسط درپوش‌های پیچی یا فویل به صورت شل بست، با نوار چسب اتوکلاو برچسب زد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو کرد. سپس وقتی که بطریها سرد شدند در آنها را سفت کنید. در طی اتوکلاو کردن درپوش‌ها باید شل باشند تا امکان ورود بخار به بطری داده شود.

پی‌پت‌های شیشه‌ای

در کشت بافت هم از پی‌پت‌های شیشه‌ای و هم پلاستیکی استفاده می‌شود. پی‌پت‌های پلاستیکی دارای این مزیت هستند که یکبار مصرف بوده و نیازی به شستشو و استریل کردن آنها نمی باشد. پی‌پت‌های شیشه‌ای ارزانتر بوده اما باید برای هر بار مصرف با دقت شستشو شوند.

نکته ایمنی) پی‌پت‌های شیشه‌ای در معرض آسیب بوده و انتهای لب پریده باعث خطر بریدگی هم برای شخص مصرف کننده و هم شخص شوینده پی‌پت‌ها می‌شود. بنابراین آنها را دور ریخته یا تعمیر کنید.

دستورکار۲-۸ – آماده سازی و استریل کردن پی‌پت‌ها

مواد

سیلندرهای پی‌پت (برای جمع آوری پی‌پت‌های استفاده شده)

ضدعفونی کننده: هیپوکلریت که وقتی در دترژنت رقیق می‌شود حداقل ۳۰۰ppm کلر داشته باشد (مثل قرص‌های Clorox، Precept یا Chloros)

دترژنت (مثل 7x یا Decon®)

جدول ۳-۸: استریلیزاسیون مایعات

Solution	Sterilization	Storage
Agar	Autoclave[1] or boil	Room temperature
Amino acids	Filter[2]	4°C
Antibiotics	Filter	−20°C
Bacto-peptone	Autoclave	Room temperature
Bovine serum albumin	Filter (use stacked filters)	4°C
Carboxylmethyl cellulose	Steam, 30 min[3]	4°C
Collagenase	Filter	−20°C
DMSO	Self-sterilizing; dispense into aliquots in sterile tubes	Room temperature; keep dark, avoid contact with rubber or plastics (except polypropylene)
Drugs	Filter (check for binding; use low- binding filter, e.g., Millex-GV, if necessary)	−20°C
EDTA	Autoclave	Room temperature
Glucose, 20%	Autoclave	Room temperature
Glucose, 1−2%	Filter (low concentrations; caramelizes if autoclaved)	Room temperature
Glutamine	Filter	−20°C
Glycerol	Autoclave	Room temperature
Growth factors	Filter (low protein binding)	−20°C
HEPES	Autoclave	Room temperature
HCl, 1 M	Filter	Room temperature
Lactalbumin hydrolysate	Autoclave	Room temperature
Methocel	Autoclave	4°C
$NaHCO_3$	Filter	Room temperature
NaOH, 1 M	Filter	Room temperature
Phenol red	Autoclave	Room temperature
Salt solutions (without glucose)	Autoclave	Room temperature
Serum	Filter; use stacked filters	−20°C
Sodium pyruvate, 100 mM	Filter	−20°C
Transferrin	Filter	−20°C
Tryptose	Autoclave	Room temperature
Trypsin	Filter	−20°C
Vitamins	Filter	−20°C
Water	Autoclave	Room temperature

[1]Autoclave, 100 kPa (15 lb/in.^{2}), 121°C for 20 min.
[2]Filter, 0.2-μm pore size.
[3]Steam, 100°C for 30 min.

سبد از جنس فولاد ضدزنگ (برای جمع آوری و خشک کردن پی‌پت‌های شسته و آبکشی شده)

نشانگرهای استریلیتی

جاپی‌پتی

برگه یا نوارهای نشانگر استریل

آون استریلیزه کننده مجهز به فن که قادر باشد تا دمای ۱۶۰°C برسد، و ترجیحاً دارای دماسنج ثبت کننده دما و کاوشگر انعطاف‌پذیرباشد.

دستور کار

جمع آوری و شستشو:

۱- آب، دترژنت و یک ضدعفونی کننده را در سیلندر پی‌پت بریزید.

۲- پی‌پت‌ها را بلافاصله پس از استفاده در سیلندر قرار دهید.

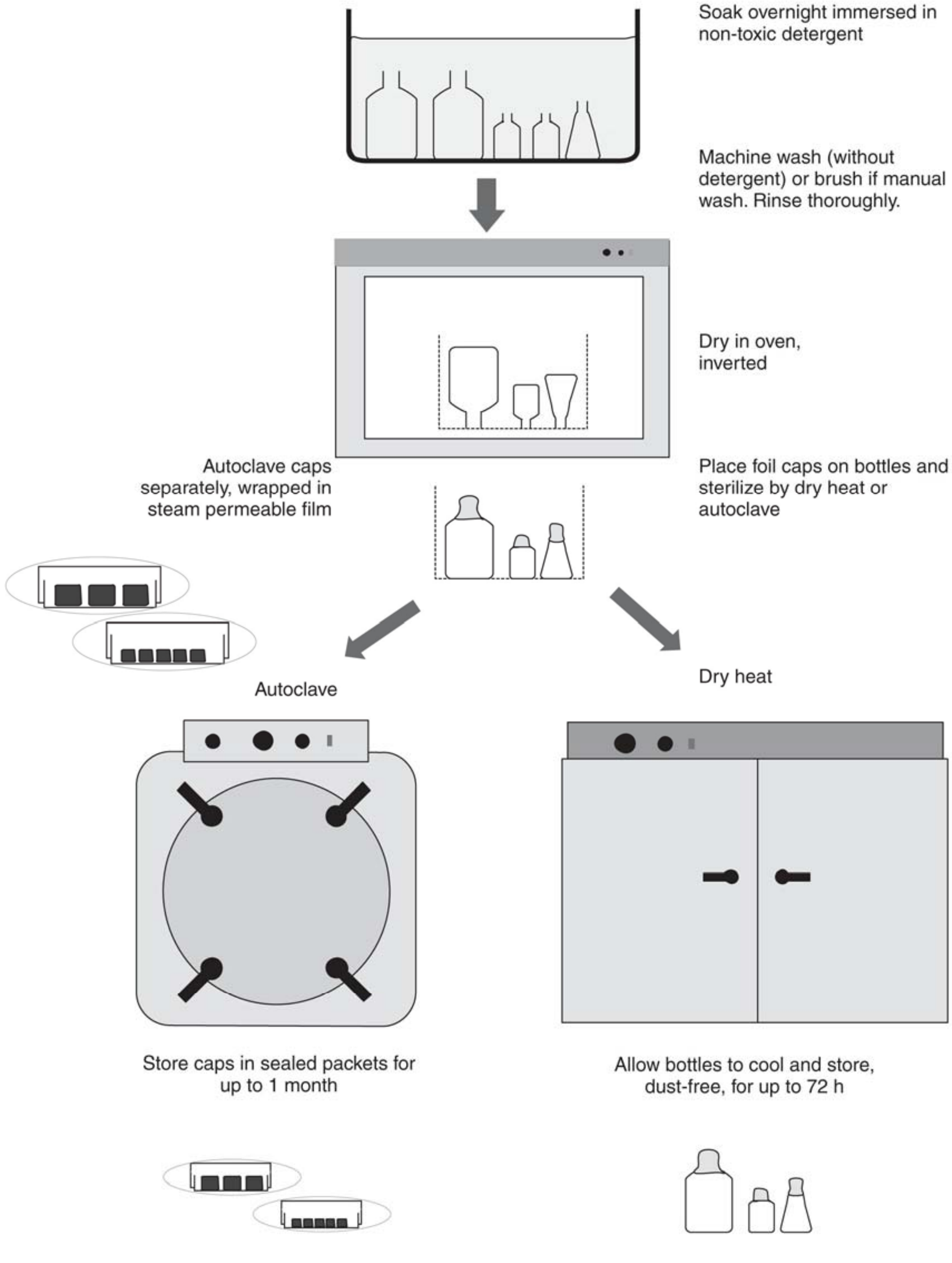
a) پی‌پت‌ها را در هود جمع نکرده یا اجازه ندهید که پی‌پت‌ها خشک شوند.

b) پی پت هایی را که برای آگار یا سیلیکون‌ها(دافع آب، ضدکف و غیره) استفاده شده اند در همان سیلندر مربوط به پی‌پت‌های دیگر قرار ندهید. برای سیلیکون‌ها از پی‌پت‌های یکبار مصرف استفاده شود و یا پی‌پت‌های آغشته به آگار را پس از استفاده در آب داغ شستشو داده و یا از پی‌پت‌های یکبار مصرف استفاده کنید.

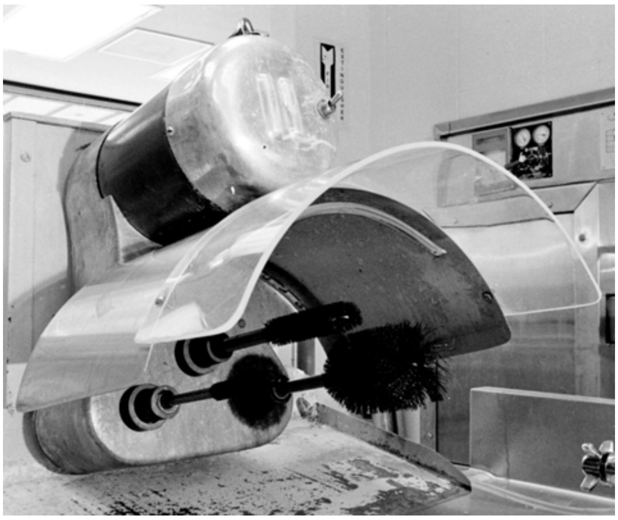
۳- پی‌پت‌ها را به مدت یک شب یا حداقل ۲ ساعت بخیسانید.

۴- بعد از خیساندن توپی‌ها را با هوای فشرده خارج کنید.

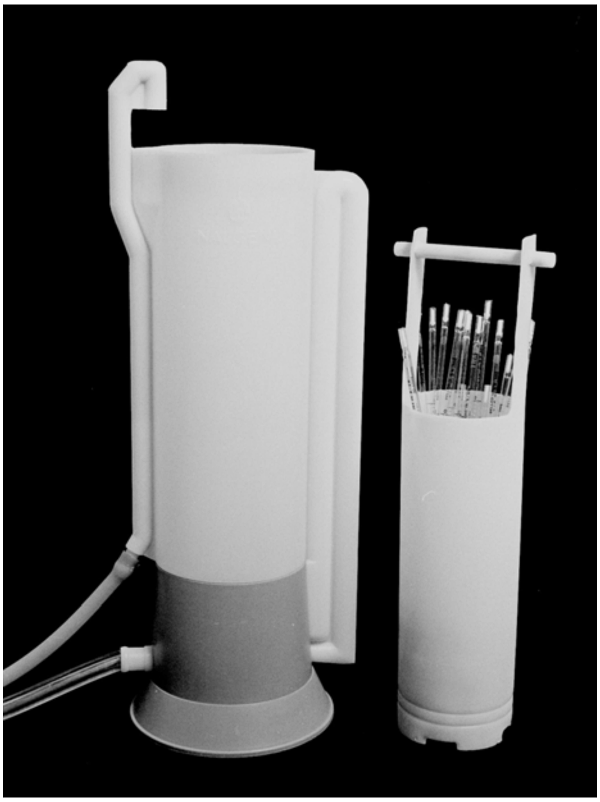
۵- پی‌پت‌ها را به صورتی که سر آنها به سمت بالا باشد به دستگاه پی‌پت شو انتقال دهید.



شکل ۱-۸: شستشو و استریلیزاسیون ظروف شیشه ای. روش کار مطابق دستور کار ۱-۸ می باشد. شرایط استریلیزاسیون: اتوکلاو در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵ دقیقه؛ آون ۱۶۰°C به مدت ۱ ساعت. درپوش ها جدا از بطری ها استریل می شوند تا از ایجاد میعان در بطری ها جلوگیری شود.



شکل ۲-۸: برس های مکانیزه مخصوص بطری. برس های گردان در زیر یک صفحه پلاستیکی شفاف قرار گرفته اند. بر روی برس نباید فشار زیادی وارد شود زیرا باعث شکسته شدن بطری می شود.



شکل ۳-۸: پی پت شوی سیفون دار. متصل به منبع اصلی آب.

۶- پی‌پت‌ها را با آب شیر با عمل siphoning یک دستگاه پی‌پت شو به مدت حداقل ۴ ساعت یا در یک ماشین شوینده اتوماتیک اما بدون دترژنت، آبکشی کنید.

۷- دریچه را برای آب دیونیزه تنظیم کرده یا منتظر شوید تا تمام آب شیر خارج شده، آب شیر را بسته و دستگاه شوینده را سه بار با آب دیونیزه پر و خالی کنید.

۸- پی‌پت‌ها را به صورتی که سر آنها به سمت بالا باشد به پی‌پت خشک‌کن یا آون خشک کننده انتقال داده و خشک کنید.

۹- در پی‌پت‌ها توپی پنبه‌ای قرار دهید.

۱۰- پی‌پت‌ها را براساس اندازه مرتب کرده و در محیط بدون گرد و غبار نگه داری کنید.

استریلیزاسیون:

۱- پی‌پت‌ها را در جا پی‌پتی قرار دهید بهتر است در هر دو طرف جا پی‌پتی اندازه پی‌پت‌ها نوشته شده باشد)

۲- هر جا پی‌پتی را با پی‌پت‌های هم اندازه پر کنید.

۳- یک جا پی‌پتی را هم با پی‌پت‌های ۱mL، ۲mL، ۱۰mL و ۲۵mL پر کنید (مثلاً از هر اندازه چهار عدد)

۴- نوار نشان دهنده استریل بودن را به آن چسبانده و تاریخ را روی آن یادداشت کنید.

۵- به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۶۰°C با حرارت خشک استریل کنید.

۶- پی‌پت‌ها را از آون خارج کرده، اجازه دهید سرد شوند و جا پی‌پتی‌ها را به آزمایشگاه کشت بافت انتقال دهید. در صورتیکه پیش بینی می‌کنید که پی‌پت‌ها برای بیش از ۴۸ ساعت باقی بمانند، اطراف در جا پی‌پتی‌ها را با نوار چسب بپوشانید.

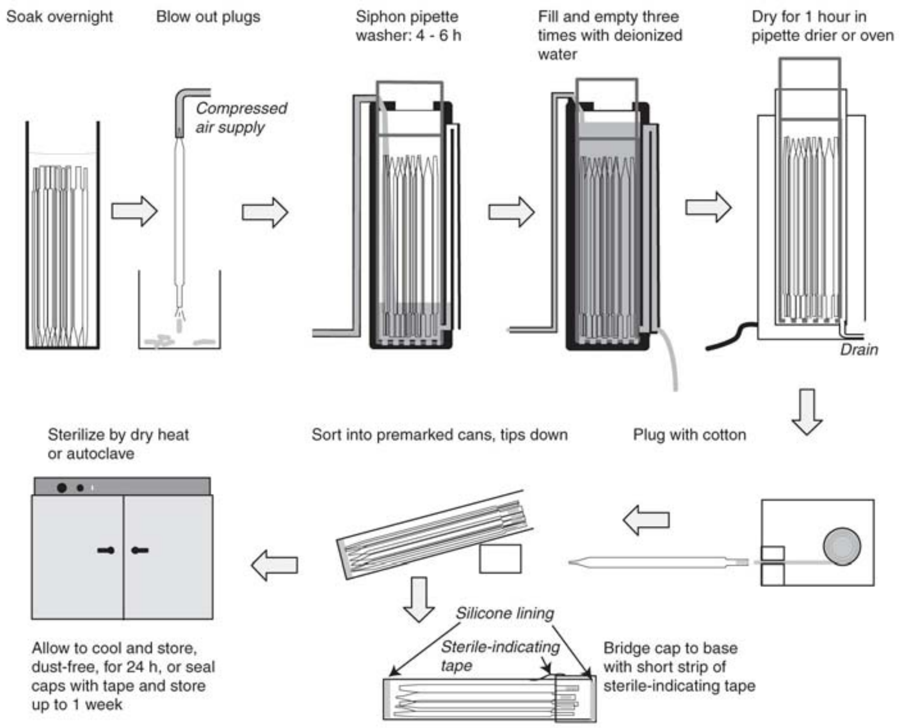
درپوش‌های پیچی

دو نوع عمده از درپوش‌ها وجود دارد که به طور متداول برای بطریهای شیشه‌ای استفاده می‌شوند:

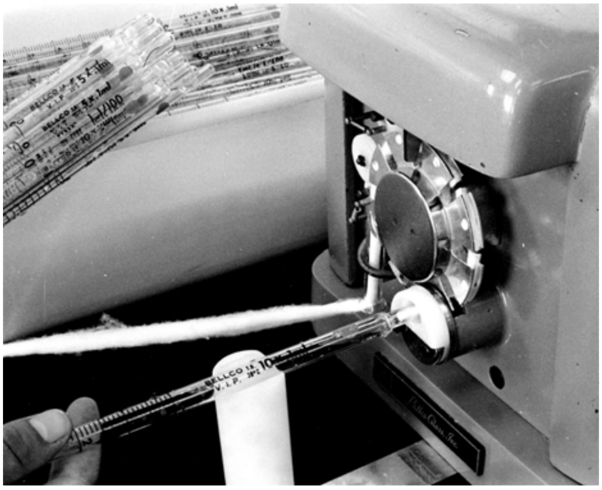
۱) درپوش‌های آلومینیومی یا پلاستیکی فنولی با آستر سیلیکونی یا پلاستیک مصنوعی و

۲) درپوش‌های پلی پروپیلن بدون آستر که قابل استفاده مجدد می‌باشند.

درپوش‌های آلومینیومی یا هر وسیله آلومینیومی دیگر را برای مدت بیش از ۳۰ دقیقه در دترژنت‌های قلیایی قرار ندهید چون به تدریج از بین می روند. ظروف شیشه‌ای و درپوش‌ها را به طور همزمان در دترژنت قرار ندهید زیرا ممکن است آلومینیوم باعث آلوده شدن شیشه‌ها شود. از دترژنت هایی که برای شستشو با ماشین ساخته شده اند استفاده نکنید چون بسیار سوزآور می‌باشند.



شکل ۴-۸: شستشو و استریل کردن پی پت ها.



شکل ۵-۸: دستگاه نیمه خودکار توپی گذار بر روی پی پت ها. یک لایه ضخیم پنبه از طریق یک دهانه بارگیری انتخابی تغذیه شده و وقتی که طول مناسبی از پنبه در انتهای پی پت قرار داده شد، یک قطعه برش داده می شود. برای پی پت های با اندازه های مختلف به ضخامت های متفاوتی از پنبه نیاز می باشد.

شکل ۶-۸: آون استریل کننده. کن های پی پت به صورتی قرار گرفته اند که برای برقراری جریان هوای داغ بین آنها فاصله وجود دارد.

دستور کار۳-۸-آماده سازی و استریلیزاسیون درپوش های پیچی

مواد

ضدعفونی کننده: هیپوکلریت دارای ۳۰۰ppm کلر (مثل قرص‌های Precept)

دترژنت (مثل $7x^{TM}$ یا $Decon^{®}$)

وان برای خیساندن ظروف

سبدهای از جنس فولاد ضدزنگ (برای جمع آوری درپوش‌ها برای شستشو و خشک کردن)

نشانگرهای استریلیتی

پتری دیش‌های شیشه‌ای (برای بسته بندی)

Film پلاستیکی قابل اتوکلاو یا جعبه‌های استریلیزاسیون کاغذی (paper sterilization bags)

نوار اتوکلاو مشخص کننده حالت استریل

اتوکلاو دارای دماسنج ثبت کننده با کاوشکر انعطاف پذیر که می‌تواند در بار جایگزین شود.

دستور کار

جمع آوری و شستشو

درپوش‌های فلزی یا فنولی دارای آستر

۱- به مدت ۳۰ دقیقه (حداکثر) در دترژنت بخیسانید.

۲- به مدت ۲ ساعت به طور کامل آبکشی کنید (مطمئن شوید که همه درپوش‌ها در آب غوطه ور می‌باشند) آسترها باید خارج شده و پس از آبکشی مجدداً در جای خود قرار گیرند که اینکار را می‌توان به دو صورت انجام داد:

a) در یک بشر (یا سطل) که جریان آب شیر توسط یک لوله در ته آن برقرار است. هر ۱۵ دقیقه یکبار درپوش‌ها را با دست به هم زنید.

b) در یک سبد یا وسیله شوینده پی‌پت، با یک ماشین شوینده خودکار آبکشی کنید اما از دترژنت استفاده نکنید.

درپوش‌های پلی پروپیلن:

این درپوش ها را می‌توان همانگونه که قبلاً شرح داده شده با دست شستشو و آبکشی نمود. چون ممکن است این درپوش‌ها شناور باشند، باید در طی خیساندن و آبکشی به طرف پایین فشار داده شوند.

برای دستگاههای شوینده خودکار بعد از خیساندن در دترژنت از دستگاه پی‌پت شو و چرخه طبیعی بدون دترژنت استفاده شود.

استریل کردن:

۳- درپوش‌ها را به صورتی که دهانه آن به سمت پایین باشد در پتری‌دیش‌های شیشه‌ای قرار دهید.

۴- درپوش‌ها را در کاغذ کارتریج یا پوشش نایلونی نفوذپذیر نسبت به بخار پیچیده و با چسب اتوکلاو بپوشانید.

۵- بسته مشابهی را که دارای شاخص استریلیتی در مرکز بار می‌باشد، تهیه کنید.

۶- به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱۰۰kPa (۱۵p. s. i) اتوکلاو کنید.

انتخاب دترژنت

هنگامی که اغلب کار کشت بر روی شیشه انجام می‌شد، کیفیت (بار و پس مانده های شیمیایی) سطح شیشه بسیار مهم بود. امروزه چون اغلب کشت سلولی بر روی پلاستیک یکبار مصرف انجام می‌شود، نیازمندیهای کلی برای تمیز کردن شیشه آلات این است که a)دترژنت در برطرف کردن پس مانده‌ها از شیشه موثر باشد و b) هیچگونه پس مانده سمی در آن باقی نمانده تا به محیط کشت یا معرف‌های دیگر وارد شود. بعضی از شرکت‌های تولید کننده مواد کشت سلولی، یک دترژنت مناسب مخصوص کشت سلولی (مثل MP Biomedicals، 7X یا Decon برای شستشوی دستی) را تولید می‌کنند اما اغلب دترژنت‌های مخصوص ماشین ظرفشویی از یک شرکت آزمایشگاهی عمومی یا تولید کننده ماشین می‌باشد.

کارایی شویندگی یک دترژنت را می‌توان با شستشوی ظروف شیشه‌ای کثیف (مثلاً یک بطری سرم یا یک محیط کشت دارای سرم که اتوکلاو شده است) مشخص نمود. بنابراین با بررسی ظاهری می‌توان فهمید که کدام دترژنت موثر بوده است. حضور یک پس مانده سمی را می‌توان با کلون کردن سلولها (مثلاً بر روی یک پتری دیش شیشه‌ای که با دترژنت شستشو داده شده و سپس آبکشی شده و اتوکلاو گردیده است) مشخص نمود. باید از یک پتری دیش پلاستیکی بعنوان کنترل استفاده شود. همچنین این تکنیک را می‌توان در مواردی که شما در مورد پس مانده‌های باقی مانده بر روی شیشه آلات پس از اتوکلاو کردن نگران هستید انجام داد.

استریلیزاسیون

روش استریلیزاسیون مورد استفاده به نوع ماده بستگی دارد (جدول ۱-۸). اشیاء فلزی بهتر است که با حرارت خشک استریل شوند. پلاستیک سیلیکون (که نسبت به پلاستیک طبیعی ترجیح داده می‌شود)، PTFE، فیلترهای نیترات سلولز، پلی کربنات و استات سلولز و غیره باید به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C در فشار ۱۰۰kPa (۱bar ،۱۵lb/in^2) استریل شوند. در اتوکلاوهای رومیزی کوچک و زودپزهای فشاری (pressure cookers) مطمئن شوید تا قبل از افزایش فشار به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه با شدت جوشیده تا تمام هوای موجود

خارج شود (مراقب باشید در ابتدا مقدار کافی آب در آن بریزید) بعد از استریلیزاسیون بخار را خارج کرده و اشیاء را بیرون آورده و در آون یا رک خشک کنید.

روشهای استریلیزاسیون دیگر

بسیاری از پلاستیک‌ها را نمی توان در معرض حرارت مورد نیاز برای اتوکلاو کردن یا استریلیزاسیون با حرارت خشک قرار داد. برای استریل کردن اینگونه وسایل آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در الکل ۷۰٪ غوطه ور کرده و سپس آنها را در زیر نور UV هود لامینار فلو خشک کنید. در مورد بعضی از انواع پلاستیک‌ها (مثل Lucite, Perspex, Plexiglas) باید دقت شود چرا که آنها در الکل و یا در معرض UV دپلیمره می‌شوند. برای استریل کردن پلاستیک‌ها می‌توان از اکسید اتیلن استفاده کرد اما دو تا سه هفته زمان مورد نیاز است تا بعد از استریلیزاسیون به طور کامل از سطح پلاستیک برطرف شود. بهترین روش برای استریل کردن پلاستیک‌ها استفاده از پرتوتابی گاما به میزان ۲۵kGy می‌باشد.

معرف‌ها و محیط‌های کشت

اغلب معرف‌ها و محیط‌های کشت را می‌توان با اتوکلاو کردن (اگر نسبت به حرارت مقاومند – مثل آب، محلولهای نمکی، هیدرولیزات‌های اسید آمینه) یا با فیلتراسیون غشایی (در صورتی که نسبت به حرارت حساسند) استریل کرد. برای اتوکلاو کردن باید محلولها را در درون شیشه بروسیلیکات یا پلی کربنات توزیع کرد و سپس در بطری بسته شده تا از تبخیر و آلودگی شیمیایی از اتوکلاو جلوگیری شود. در صورت استفاده از بطریهای شیشه‌ای سودا (soda) بهتر است که در آن شل باشد تا امکان شکستن آنها به حداقل برسد.

آب

آب مورد استفاده برای کشت بافت، مخصوصاً در مورد محیط کشت بدون سرم، باید از خلوص بسیار بالایی برخوردار باشد. چهار روش عمده شامل اسمز معکوس، تقطیر، دیونیزاسیون و فیلتراسیون کربن برای خالص سازی آب وجود دارد. برای تهیه آب بسیار خالص (ultrapure water: UPW) ، معمولاً اولین مرحله اسمز معکوس می‌باشد، اما می‌توان از تقطیر هم استفاده کرد. تقطیر این مزیت را دارد که در این روش آب توسط حرارت استریل می‌شود اما این روش گرانتر بوده و لازم است که دستگاه جوشنده به طور مرتب تمیز شود. آب در دمای ۱۲۱°C با فشار ۱۰۰kPa (۱۵lb/in^2، ۱bar) به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه استریل می‌شود. آب را در مقادیر مورد نیاز در ظروف مناسب توزیع کنید.

محلولهای متعادل نمکی

محلول Hanks’s BSS باید در pH کمتر از ۶/۵ اتوکلاو شود تا از رسوب فسفات کلسیم و منیزیوم جلوگیری شود و سپس قبل از استفاده pH باید خنثی شود. محلول Dulbecco’s PBS (D-PBS) بدون کلسیم و منیزیوم (D-PBSA) ساخته می‌شود. DPBS اغلب بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} استفاده می‌شود و در این حالت به آن D-PBSA یا D-PBS بدون Ca^{2+} یا Mg^{2+} گفته می‌شود. در کل این کتاب از واژه D-PBSA استفاده می‌شود. همچنین D-PBS برای تشخیص و فرمولاسیون Dulbecco از بافر نمکی فسفات ساده (PBS) استفاده می‌شود که فاقد کلرید پتاسیم بوده و فقط کلریدسدیم ایزوتونیک با بافر فسفات می‌باشد و نباید بعنوان یک محلول نمکی متعادل تلقی شود.

اغلب محلولهای متعادل نمکی حاوی گلوکز می‌باشند و چون ممکن است در طی اتوکلاو قند کاراملیزه شود (caramelize) بهتر است که بعد از اتوکلاو کردن اضافه گردد. اگر گلوکز به صورت غلظت ۱۰۰ برابر تهیه شود (۲۰۰g/L)، کاراملیزاسیون در طی اتوکلاو کردن کاهش می‌یابد و می‌توان آن را با غلظت ۲۵-۵ mL/L استفاده کرده تا غلظت ۱-۵g/L بدست آید.

دستور کار ۴-۸- تهیه و استریلیزاسیون D-PBSA

طرح کلی

پودر را با هم زدن حل کرده، به حجم نهایی رسانده، pH و هدایت (conductivity) را چک کرده و سپس در مقادیر مناسب توزیع کرده و اتوکلاو کنید.

مواد

غیر استریل:

پودر D-BSS (محلول A فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+}) بسته ۱ لیتری

آب بسیار خالص (UPW) یک لیتر

ظرف:

آسپیراتور یک لیتری از جنس شیشه شفاف یا پلاستیک شفاف که دارای شیر خروجی در پایین می‌باشد

یا

فلاسک ارلن مایر یا بطری، پمپ پریستالتیک و لوله

بطری مدرج ۱۰۰mL برای ذخیره سازی از جنس شیشه بروسیلیکات، ۱۰ عدد

همزن مغناطیسی

هدایت سنج یا اسمزسنج

pH متر

چسب اتوکلاو یا برگه‌های نشان دهنده استریلیتی

اتوکلاو

دستور کار

۱- یک لیتر آب UPW را به ظرف اضافه کنید.
۲- ظرف را روی همزن مغناطیسی قرار داده و در دور ۲۰۰rpm تنظیم کنید.
۳- جعبه پودر D-BSS را باز کرده و مقدار مورد نظر از پودر را به آرامی به ظرف اضافه کنید.
۴- تا زمانیکه پودر به طور کامل حل شود عمل همزنی را ادامه دهید.
۵- pH و هدایت آن را بررسی کرده و یادداشت کنید.
a) pH نباید بیش از ۰/۱ واحد pH اختلاف داشته باشد (pH ممکن است در فرمولاسیون‌های مختلف متفاوت باشد).
b) هدایت نباید بیش از ٪۵ از ۱۵۰ μScm^{-1} اختلاف داشته باشد. می‌توان به جای هدایت از اسمولالیتی استفاده کرد و باید بین بچ‌ها از ثبات یکسانی برخوردار باشد.
c) نمونه را دور ریخته و به استوک اصلی باز نگردانید.
۶- محتویات ظرف را در بطریهای مدرج بریزید.
۷- در بطریها را بسته و محکم کنید.
۸- یک تکه کوچک چسب اتوکلاو به آن بچسبانید.
۹- به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار (۱۵lb/in^2، ۱bar) ۱۰۰ kPa اتوکلاو کنید.
۱۰- محلول را در درجه حرارت اتاق ذخیره کنید.

تهیه و استریلیزاسیون محیط‌های کشت

در طی تهیه محلولهای پیچیده باید دقت کافی صورت گرفته تا اطمینان حاصل شود که تمام اجزای تشکیل دهنده حل شده اند و در طی استریلیزاسیون به خارج فیلتر نمی شوند و اینکه پس از اتوکلاو کردن یا ذخیره سازی در محلول باقی می‌مانند. محیط کشت‌های غلیظ اغلب برای اینکه تمام اجزای تشکیل دهنده به صورت محلول باقی بمانند، در pH پایین (بین ۳/۵ تا ۵) تهیه می‌شوند اما در این شرایط هم ممکن است مقداری رسوب در محلول تشکیل شود. در صورتیکه اجزاء تشکیل دهنده مجدداً به طرز صحیح به حالت تعلیق درآورده شوند، معمولاً این اجزاء در هنگام رقیق سازی مجدداً حل می‌شوند. اما در صورتیکه در نتیجه تجزیه تعدادی از اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت، رسوب تشکیل شده باشد، ممکن است کیفیت محیط کشت کاهش یابد. در صورت تشکیل رسوب باید کیفیت محیط کشت با کشت سلولی و کلونینگ و یک آزمون مناسب از عملکردهای اختصاصی چک شود.

محیط کشت تجاری به سه صورت تهیه می‌شوند:

۱) محلول‌های با غلظت مناسب برای کار که دارای گلوتامین بوده و یا فاقد آن می باشند.
۲) محیطهای کشت غلیظ ×۱۰، معمولاً بدون $NaHCO_3$ و گلوتامین که به صورت محلولهای غلیظ مجزا در دسترسی می‌باشند.
۳) محیطهای کشت پودری، دارای بی‌کربنات سدیم و گلوتامین و یا فاقد آن. محیطهای کشت پودری جزء ارزانترین محیطهای کشت می‌باشند. کنترل کیفیت محیطهای کشت پودری از لحاظ ویژگیهای تسهیل کننده رشد توسط شرکت سازنده انجام می‌گیرد اما از لحاظ استریل بودن چک نمی‌شوند. محتویات یک جعبه را می‌توان برای استفاده در مقادیر کمتر تقسیم کرد. هر چند در عمل بهتر است که اندازه بسته متناسب با حجمی باشد که شما قصد تهیه آن را دارید زیرا وقتی که جعبه باز می‌شود، ممکن است بعضی از اجزاء سازنده تجزیه شده و تعدادی ته نشین شوند.

محلول‌های ده برابر غلظت در هر لیتر تقریباً دو برابر گرانتر از محیط های کشت پودری می‌باشند اما نیازی به استریل کردن ندارند. خرید محیطهای کشت، با غلظت مناسب برای کار، گرانترین حالت بوده (در حدود پنج برابر هزینه محلول غلیظ×۱۰) ، اما کار با آن بسیار راحتر بوده و به هیچگونه آماده سازی بیشتری به جز افزودن سرم (در صورت نیاز) نیاز نمی باشد.

دستور کار۵-۸- آماده سازی محیط کشت از استوک ×۱

طرح کلی

فرمول محیط کشت چک شود، در صورتی که کامل باشد می‌توان محیط کشت را بعد از افزودن سرم (در صورت نیاز) به طور مستقیم مصرف کرد در صورتیکه فرمولاسیون کامل نبود (مثلاً فاقد گلوتامین یا بی کربنات بود) محلول استوک غلیظ مناسب را اضافه کنید.

نکته) یک مکمل (مثل سرم یا آنتی بیوتیک)، جزئی می‌باشد که در فرمولاسیون اولیه وجود نداشته و به محیط کشت اضافه می‌شود. بنابراین لازم است که در مقالات ذکر شود. افزودنیهای دیگر (مثل گلوتامین یا $NaHCO_3$) قسمتی از فرمولاسیون بوده و مکمل نمی باشند. بنابراین لازم نیست که در مقالات ذکر شود مگر اینکه غلظت آنها تغییر کرده باشد.

مواد

استوک محیط کشت مثلاً Eagle's MEM با نمک های Hanks، ۱۰۰mL

گلوتامین ۲۰۰mM (لازم است که ذوب شود)، ۱ mL

سرم: گوساله، جنین گاو و غیره (لازم است که ذوب شود)، ۱۰mL

آنتی بیوتیک‌ها (برای استفاده روتین توصیه نمی‌شود):

پنی سیلین در BSS یا D-PBSA ۱۰۰۰۰U /mL، ۰/۵mL

استرپتومایسین در BSS یا D-PBSA ۱۰mg/mL، ۰/۵mL

دستورکار

۱- فرمولاسیون محیط کشت چک شده و مشخص شود که چه چیزهایی باید به آن اضافه گردد.

۲- محیط کشت، مکمل‌ها و افزودنیهای دیگر را به زیر هود انتقال دهید.

۳- در صورتیکه بطریها با پوشش پلی اتیلن پوشیده شده‌اند، پوشش آنها را باز کرده و آنها را با اتانول ٪۷۰ سواب کنید.

۴- در بطریها را باز کنید.

۵- حجم مناسبی از مواد افزودنی مورد نیاز به بطری استوک افزوده تا رقت صحیح تهیه شود. برای تهیه حجم ۱۰۰mL مواد زیر را استفاده کنید:

گلوتامین ۲۰۰mM ، ۱mL

آنتی‌بیوتیک (در صورت استفاده)، ۰/۵mL از هر کدام

سرم، ۱۰mL (برای ٪۱۰)

a) برای هر بار اضافه کردن مواد از یک پی‌پت متفاوت استفاده کنید.

b) بعد از هر بار استفاده از استوک جدید، آن استوک را به طرف دیگر هود انتقال داده تا بدانید که آن استوک استفاده شده است.

c) پس از اینکه محیط کشت کامل شد همه افزودنیها یا مکمل‌ها را خارج سازید.

۶- این دستور کار مربوط به محیط کشت MEM با نمکهای Hanks بوده که دارای غلظت بی کربنات پایینی می‌باشد (۴mM). در صورت استفاده از MEM با نمک‌های Earle یا محیط کشت دیگر دارای غلظت بالای بی کربنات (۲۳mM) آن را با ٪۵ CO_2 گازدهی کنید. گاز را به محیط کشت دارای سرم ندمید، زیرا محیط کشت کف کرده و از دهانه ظرف بیرون آمده و احتمال آلودگی را افزایش می دهد.

۷- در بطری ها را ببندید.

۸- بر روی برچسب نوع مواد افزودنی تاریخ و مشخصات را یادداشت کنید.

۹- محیط کشت را به دمای ۴°C برگردانده یا مستقیماً استفاده کنید.

۱۰- در صورتیکه از یک محیط کشت برای اولین بار استفاده می‌کنید مقداری از آن را در یک فلاسک یا پتری دیش ریخته و حداقل به مدت یک ساعت تحت شرایط استاندارد قرار داده تا اطمینان حاصل شود که pH در مقدار صحیح به تعادل می‌رسد. در غیر اینصورت مجدداً pH محیط کشت را تنظیم کرده و دوباره اینکار را تکرار کنید و یا غلظت CO_2 را تغییر دهید.

دستور کار ۶-۸- تهیه محیط کشت از محلول غلیظ ×۱۰

طرح کلی

مقادیر مورد نظر از آب مقطر دیونیزه را استریل کنید. محیط کشت غلیظ و اجزاء دیگر را به آن اضافه کرده و pH را تنظیم کنید و محلول را مصرف کرده یا آن را به یخچال باز گردانید.

A: برای فلاسک کشت بسته با فازگازی هوا، غلظت HCO_3^- کم، غلظت CO_2 اتمسفری و ظرفیت بافری کم:

مواد

پی‌پت

مقادیر آب از قبل اندازه گیری شده ۴۴۳mL

محیط کشت با غلظت ×۱۰ مثل MEM با نمکهای Hanks ۵۰mL

گلوتامین ۲۰۰mM (لازم است که ذوب شود) تا غلظت نهایی ۲mM بدست آید .... ۵ mL

$NaHCO_3$، ٪۷/۵(۰/۸۹M) تا غلظت نهایی ۴mM بدست آید .... ۵ mL

سرم جنین یا نوزاد گاو (لازم است که ذوب شود) تا در نهایت به ٪۱۰ برسد .... ۵۰ mL

آنتی بیوتیک در صورت نیاز (برای استفاده روتین توصیه نمی شود):

پنی سیلین ۱۰۰۰۰U /mL تا غلظت نهایی ۵۰U/mL بدست آید .... ۲/۵ mL

استرپتومایسین ۱۰mg/mL تا غلظت نهایی ۵۰µg/mL بدست آید ۲/۵mL

۱M HEPES (در صورت نیاز) ۵-۱۰mL

۱M NaOH(در صورت نیاز) به مقدار مورد نیاز

دستور کار

۱- سرم و گلوتامین را ذوب کرده و به زیر هود انتقال دهید.

۲- بطریهای که در حمام آب بوده اند را قبل از قراردادن در زیر هود سواب کنید.

۳- مواد سازنده را مطابق روشی که در قسمت محلولهای استریل ذکر شده است اضافه کنید. ممکن است برای افزایش ظرفیت بافری از HEPES استفاده شود و برای برخی از رده‌های سلولی در دانسیته سلولی بالا در صورتی که مقدار زیادی اسید تولید شود ممکن است فلاسک به اتمسفر تهویه شود.

۴- سود ۱M اضافه کرده تا در دمای ۲۰°C به pH ۷/۲ برسد. وقتی که محیط کشت در دمای ۳۷°C انکوبه شود، pH محیط کشت به ۷/۴ افزایش می‌یابد اما ممکن است لازم باشد که وقتی اینکار برای بار اول انجام می‌شود توسط تیتراسیون چک شود.

B- برای کشت‌های در ظروف درباز در انکوباتور CO_2 یا در فلاسک‌های دربسته دارای٪۵ CO_2 و غلظت بالای بی‌کربنات.

محلولهای استریل برای تهیه ۵۰۰mL محیط کشت:

آب UPW .... ۴۴۳ mL

محیط کشت با غلظت ×۱۰ مثل MEM با نمکهای Earle.. ۵۰mL

۴- سود ۱M اضافه کرده تا در دمای ۲۰°C به pH۷/۲ برسد. وقتی که محیط کشت در دمای ۳۷°C انکوبه شود، pH محیط کشت به ۷/۴ افزایش می‌یابد، اما ممکن است لازم باشد که وقتی اینکار برای بار اول انجام می‌شود توسط تیتراسیون چک شود (تنظیم pH در زیر را ببینید).

a) ۵mL در هر یک از ۵ پتری دیش توزیع کنید.

b) مقادیر مختلفی از سود ۱N از ۵ تا ۵۰µL به هر پتری دیش اضافه کنید.

c) برای مدت حداقل ۲ ساعت و ترجیحاً به مدت یک شب تحت شرایط ٪۵ CO_2 انکوبه کنید.

C) برای کشت‌های موجود در فلاسک‌های در باز در انکوباتور CO_2 یا فلاسک‌های دربسته دارای ٪۲ CO_2 و غلظت متوسط بی کربنات

محلولهای استریل برای تهیه ۵۰۰mL محیط کشت

آب UPW.. ۴۴۳ mL

محیط کشت با غلظت ×۱۰ مثل Ham's F12..... ۵۰mL

گلوتامین ۲۰۰mM (لازم است که ذوب شود) تا به غلظت نهایی ۲mM برسد... ۵mL

$NaHCO_3$ ٪۷/۵ (۰/۸۹M)تا به غلظت نهایی ۸mM برسد ۹mL

۱M HEPES تا به غلظت نهایی ۲۰mM برسد.... ۱۰mL

سرم نوزاد یا جنین گاو ۵۰mL

آنتی بیوتیک در صورت نیاز (برای استفاده روتین توصیه نمی‌شود):

گلوتامین ۲۰۰mM (لازم است که ذوب شود) تا به غلظت نهایی ۲mM برسد... ۵mL

$NaHCO_3$ ٪۷/۵ تا به غلظت نهایی ۲۶mM برسد .... ۱۴/۵ mL

سرم نوزاد یا جنین گاو ۵۰mL

آنتی بیوتیک در صورت نیاز (برای استفاده روتین توصیه نمی‌شود):

پنی سیلین ۱۰۰۰۰U/mL................................ ۲/۵mL

استرپتومایسین ۱۰mg/mL.............................. ۲/۵ mL

سود ۱M.. به مقدار مورد نیاز

دستور کار

۱- سرم و گلوتامین را ذوب کرده و به زیر هود انتقال دهید.

۲- بطریهایی که در حمام آب بوده اند را قبل از قرار دادن در هود سواب کنید.

۳- مواد سازنده را مطابق روشی که در قسمت محلولهای استریل ذکر شد اضافه کنید.

پنی سیلین ۱۰۰۰۰U/mL ۲/۵mL

استرپتومایسین ۱۰mg/mL................................. ۲/۵ mL

سود ۱N... به مقدار مورد نیاز

دستور کار

۱- سرم و گلوتامین را ذوب کرده و به زیر هود انتقال دهید.

۲- بطریهایی که در حمام آب بوده اند را قبل از قرار دادن در هود سواب کنید.

۳- مواد سازنده را مطابق روشی که در قسمت محلولهای استریل ذکر شد اضافه کنید.

۴- سود ۱M اضافه کرده تا در دمای ۲۰°C به pH۷/۲ برسد. وقتی که محیط کشت در دمای ۳۷°C انکوبه شود، pH محیط کشت به ۷/۴ افزایش می‌یابد اما ممکن است لازم باشد که وقتی اینکار برای بار اول انجام می‌شود توسط تیتراسیون چک شود (تنظیم pH در زیر را ببینید).

در صورت نیاز به مواد دیگر در صورتیکه این اجزاء اضافی در آب ساخته می‌شوند لازم است قبل از اضافه کردن آن یک حجم معادل با آن ماده را از میزان آب موجود در بطری خارج کنید. اگر اجزاء سازنده اضافی در نمک ایزوتونیک هستند، می‌توان آنها را به حجم نهایی محیط کشت اضافه کرد. چون سرم ایزوتونیک می‌باشد، می‌توان آن را به حجم نهایی اضافه کرد هر چند اینکار مواد مغذی محیط کشت را رقیق خواهد کرد.

همیشه pH را در دمای ۳۷°C متعادل و چک کنید زیرا با افزایش دما حلالیت CO_2 کاهش یافته و pK_a مربوط به HEPES تغییر خواهد کرد.

تنظیم pH: میزان باز مورد نیاز برای خنثی کردن محیط کشت غلیظ ۱۰× (که به منظور حفظ حلالیت اجزاء تشکیل دهنده اسیدی می‌باشد) ممکن است از یک بچ به بچ دیگر و از یک محیط کشت به محیط کشت دیگر متفاوت باشد و در عمل، تیتراسیون محیط کشت تا pH ۷/۴ در دمای ۳۷°C گاهی اوقات کمی مشکل است. وقتی یک محیط کشت جدید برای اولین بار ساخته می‌شود، مقدار معینی $NaHCO_3$ اضافه کرده و اجازه دهید که نمونه به مدت یک شب با مقادیر مختلفی از باز در دمای ۳۷°C در فاز گازی مناسب به تعادل برسد. صبح روز بعد pH را چک کرده مقدار صحیح باز را ا انتخاب کرده و بقیه محیط کشت را برحسب آن تهیه کنید.

افزودنی های محیط کشت: در صورتیکه مصرف محیط کشت شما بالا می‌باشد (بیشتر از ۲۰۰ لیتر در سال) و شما محیط کشت را به صورت آماده خریداری می‌کنید، ممکن است بهتر باشد، اجزاء سازنده اضافی موجود در فرمولاسیون را به صورت مجزا تهیه کنید. گلوتامین اغلب به صورت مجزا تهیه می‌شود زیرا ناپایدار است؛ بهتر است که گلوتامین به صورت جداگانه خریداری شده و به صورت منجمد ذخیره شود. نیمه عمر گلوتامین در محیط کشت در دمای ۴°C حدود سه هفته و در دمای ۳۷°C در حدود یک هفته می‌باشد. بعضی از دی پپتیدهای گلوتامین پایداری آن را افزایش داده در حالیکه bioavailability گلوتامین حفظ می‌شود. یک نمونه از این نوع گلوتامین، Glutamax از شرکت Gibco می‌باشد.

ته نشینی: در محلولهای غلیظ ۱۰×، باید همه اجزاء سازنده قبل از رقیق کردن به صورت محلول یا حداقل به صورت سوسپانسیون یکنواخت باشند. بعضی از اجزاء سازنده (مثل اسید فولیک یا تیروزین) می‌توانند رسوب کرده و در هنگام رقیق کردن از دست می‌روند. ممکن است انکوباسیون در دمای ۳۷°C این مشکل را مرتفع سازد.

کنترل کیفیت: هنگامی که خاصیت افزایش دهندگی رشد و خصوصیات دیگر یک بچ از محیط کشت تست می‌شود، اگر نتایج رضایت بخش بود، دیگر نیاز نمی باشد که هر دفعه تست شود. هر چند باید استریل بودن محیط کشت حاصل از رقیق کردن محلول غلیظ ۱۰× را با انکوبه کردن مقداری از محیط کشت کامل در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت چک کرد.

محیط‌های کشت پودری

دستورالعمل آماده سازی محیط‌های کشت پودری به همراه هر بسته وجود دارد. اندازه‌ای را انتخاب کنید که قادر باشید همه آن را یکبار ساخته و در عرض سه ماه مصرف کنید. فرمولاسیونی را انتخاب کنید که فاقد گلوتامین است. همچنین در صورتیکه در فرمولاسیون اجزاء ناپایدار دیگری وجود دارد باید آنها را حذف کرده و بعداً درست قبل از مصرف بصورت یک محلول غلیظ استریل تهیه و به محیط کشت اضافه کرد.

دستور کار۷-۸ – تهیه محیط کشت از پودر

طرح کلی

محتویات کامل جعبه را در حجم مناسبی از آب بسیار خالص بریزید. پودر را به صورت تدریجی به ظرف آبی که بر روی همزن مغناطیسی در حال همزنی می‌باشد اضافه کنید. وقتی پودر به طور کامل حل شد باید محیط کشت را فیلتر کرده و اجازه داده نشود که محیط کشت به صورت فیلتر نشده باقی بماند زیرا ممکن است اجزاء سازنده رسوب کرده یا آلودگی میکروبی گسترش یابد. بهتر است که pH بعد از افزودن مواد سازنده نهایی (مثل گلوتامین، $NaHCO_3$ یا سرم) به محیط کشت تنظیم گردد.

مواد

استریل:

بطریهای مدرج ۱۰۰mL مخصوص محیط کشت............ ۱۰

درپوش برای بطریها ۱۰

ظروف یونیورسال (Universal Containers) برای نمونه برداری کنترل میکروبی ۳

غیراستریل:

آب بسیار خالص(UPW).. ۱L

محیط کشت پودری شکل مثل MEM با نمکهای Earle بدون گلوتامین .... پاکت ۱ لیتری

فلاسک ارلن مایر یا بطری مدرج ۱L............................... ۱

همزن مغناطیسی و دانه مغناطیسی دارای پوشش PTFE، ۵۰mm ۱

هدایت سنج

دستور کار

۱- حجم مناسبی از آب بسیار خالص را به ظرف اضافه کنید.

۲- دانه مغناطیسی را به ظرف اضافه کنید.

۳- ظرف را روی همزن مغناطیسی قرار داده و دستگاه را در حدود ۲۰۰rpm تنظیم کنید.

۴- جعبه پودر را باز کرده و محتویات آن را به آرامی به ظرف اضافه کنید.

۵- تا زمانی که پودر به طور کامل حل شود همزنی را ادامه دهید.
۶- pH و هدایت نمونه را چک کرده و یادداشت کنید.
a) pH باید در محدود ۰/۱ واحد از pH مورد نظر باشد.
b) هدایت باید در محدوده ۲٪ از مقدار مورد نظر باشد.
c) نمونه را دور ریخته و مجدداً به استوک اصلی بر نگردانید.
۷- محلول را توسط فیلتراسیون استریل کنید.
۸- در بطری‌ها را بسته و محکم کنید.
۹- آنها را در دمای ۴°C ذخیره کنید.
۱۰- در صورت نیاز درست قبل از مصرف، به محیط کشت سرم و گلوتامین اضافه کرده و pH را در ۷/۴ تنظیم کنید.

برای افرادی که مقادیر کمتری (کمتر از یک لیتر در هفته) یا چندین نوع مختلف محیط کشت را مصرف می‌کنند، ممکن است در حجم‌های کمتر تهیه شده و با گلوتامین کامل شود و سپس مستقیماً با استفاده از بطریهایی که در قسمت سر، فیلتر استریل کننده دارند و یا توسط فلاسک‌های فیلتردار به داخل بطریهای ذخیره سازی فیلتر گردد. در این روش و سیستم‌های دیگر فیلتراسیون فشار منفی، ممکن است مقداری از CO_2 حل شده در طی فیلتراسیون از دست رفته و pH افزایش یابد. محیط کشت مجدداً درداخل انکوباتور به حالت تعادل می‌رسد به شرطی که مقدار مناسب از $NaHCO_3$ در محیط کشت وجود داشته باشد اما وقتی که محیط کشت برای بار اول استفاده می‌شود باید این موضوع را ثابت کرد.

محیط کشت سفارشی (Customized medium)

در صورتی که قصد دارید فرمولاسیون‌های مختلفی را بررسی کنید و یا اگر قرار است محیط کشت از اجزاء سازنده مجزا ساخته شود، راحتر است که تعدادی استوک غلیظ ساخته شود. اسیدهای آمینه در غلظت ۵۰× یا ۱۰۰×، ویتامین در غلظت ۱۰۰۰×، تیروزین و تریپتوفان در غلظت ۵۰× در اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال، گلوکز در غلظت ۲۰۰g/L و BSS در غلظت ۱× ساخته شود. سپس مقادیر لازم از هر محلول غلیظ، مخلوط شده و با یک فیلتر استریل کننده دارای منافذ ۰/۲μm استریل شده و با BSS رقیق می‌شود.

دستور کار۸-۸- تهیه محیط کشت سفارشی

طرح کلی

استوک‌های غلیظ را تهیه کرده و به صورت منجمد ذخیره کنید. در مواقع نیاز آنها را ذوب کرده و مخلوط نمایید. با فیلتراسیون استریل کرده و تا زمان مورد نیاز ذخیره کنید.

مواد

محلول غلیظ اسیدهای آمینه در آب با غلظت ۱۰۰× که به صورت منجمد نگه داری می‌شود

تیروزین و تریپتوفان با غلظت ۵۰× در اسید کلریدریک ۰/۱M

ویتامین‌ها با غلظت ۱۰۰۰×در آب

گلوکز با غلظت ۱۰۰× (۲۰۰g/L در BSS)

محلولهای دیگر (مثل عناصر کمیاب و نوکلئوزیدها، اما نه لیپیدها، هورمونها یا فاکتورهای رشد که باید درست قبل از استفاده از محیط کشت اضافه شوند)

بطریهای ذخیره سازی با اندازه مناسب برای رقت‌های بعدی

دستور کار

۱- محلولها را ذوب کرده و مطمئن شوید که همه مواد حل شدنی مجدداً حل شده اند.
۲- اجزاء تشکیل دهنده را با نسبت‌های مناسب مخلوط کنید.
a) محلول غلیظ اسیدهای آمینه............................ ۱۰۰mL
b) تیروزین و تریپتوفان.. ۲۰۰mL
c) ویتامین‌ها ۱۰mL
d) گلوکز ۱۰۰mL
۳- محلولها را مخلوط کرده و با فیلتراسیون استریل کنید.
۴- به صورت منجمد ذخیره کنید.
۵- برای مصرف ۴۱mL از مخلوط غلیظ را با ۹۵۹mL از BSS ×۱ استریل رقیق کنید.
۶- PH را در ۷/۴ تنظیم کنید.
۷- در دمای ۴°C ذخیره کنید.
۸- سرم یا مکملهای دیگر مثل هورمونها، فاکتورهای رشد و لیپیدها را درست قبل از استفاده از محیط کشت اضافه کنید. همچنین اگر فلزات به صورت عناصر کم مقدار استفاده می‌شوند، بهتر است که درست قبل از مصرف به محیط کشت اضافه شوند، زیرا ممکن است در حضور فسفات موجود در استوکهای غلیظ، ته نشین شوند.

مزیت این نوع طرز تهیه محیط کشت این است که می‌تواند متفاوت باشد؛ می‌توان مواد مغذی دیگر (کتواسیدها، نوکلئوزیدها، مواد معدنی و غیره) را اضافه کرد یا محلول‌های استوک اصلی را متناسب با نیازمندی تغییر داد، اما عملاً این روش به قدری پر زحمت و وقتگیر است که تعداد کمی از آزمایشگاهها محیط کشت مورد نیاز را از اجزاء سازنده اصلی می‌سازند، مگر اینکه قصد داشته باشند اجزاء محیط کشت را تغییر دهند. قابل اعتماد بودن محیط‌های کشت تجاری کاملاً وابسته به بکارگیری معیارهای کنترل کیفیت مناسب می‌باشد.

استریلیزاسیون محیط‌های کشت

محیط‌های کشت قابل اتوکلاو:

بعضی از شرکت‌های سازنده، نمونه‌های قابل اتوکلاو از Eagle’s MEM و محیط‌های کشت دیگر ارائه می‌کنند. اتوکلاو کردن کم زحمت و ارزانتر بوده و در مقایسه با فیلتراسیون خطای کمتری دارد. روش استریل کردن در دستور کار شرکت سازنده موجوده بوده و مشابه روشی است که قبلاً برای BSS ذکر شد. محیط کشت باسوکسینات در pH ۴/۲۵ بافری شده تا ویتامین‌های B در طی اتوکلاو کردن پایدار باشند و سپس بعد از اتوکلاو pH خنثی می‌شود. به جای گلوتامین از گلوتامات استفاده شده یا بعد از اتوکلاو کردن، به صورت استریل به محیط کشت اضافه می‌شود. BSS بدون گلوکز و گلوتامین قابل اتوکلاو کردن می‌باشد و همچنین هیدرولیزات‌های مختلف اسید آمینه از قبیل تریپتوفسفات براث و محیط‌های کشت میکروبی دیگر قابل اتوکلاو کردن می‌باشند .

فیلتراسیون استریل

فیلتراسیون با فیلترهای دارای منافذ ریز ۰/۲μm – ۰/۱، روش انتخابی برای استریل کردن محلولهای حساس به حرارت می‌باشد. انواع مختلفی از فیلترها از جنس‌های متنوعی مثل polyethersulphone (PES)، نایلون، پلی کربنات، استات سلولز، PTFE و سرامیک و در اندازه‌های متنوع از فیلتر سرسرنگی تا فیلترهای کارتریج چند صفحه‌ای ساخته شده‌اند.

دستور کار۹-۸- فیلتراسیون استریل با فیلتر سرسرنگی

مواد و وسایل

استریل:

سرنگ پلاستیکی با حجم ۵۰mL-۱۰

فیلتر سرسرنگی

ظرف مناسب (مثل ظرف یونیورسال)

غیر استریل:

محلول برای استریلیزاسیون(۱۰۰mL-۵)

دستور کار

۱- هود را سواب کرده و وسایل مورد نیاز را به زیر هود انتقال دهید.

۲-سرنگ را با محلول پر کنید.

۳- در ظرف استریل را بردارید.

۴- فیلتر را از جعبه خارج کرده و آن را به سر سرنگ وصل کنید. زمانیکه فیلتر را به سرنگ وصل می‌کنید نیمه پایینی فیلتر را که هنوز در جعبه قرار دارد، نگه دارید.

۵- با فشار، محلول را از فیلتر به داخل ظرف وارد کنید. فقط فشار متوسط برای این کار لازم است.

۶- در ظرف را ببندید.

۷- سرنگ و فیلتر را دور بیاندازید.

سرنگ را می‌توان چندین بار مورد استفاده قرار داد به صورتی که فیلتر را به نیمه پایینی بسته‌بندی استریل باز گردانده، آن را از سرنگ جدا کرده، سرنگ را مجدداً پرکرده و دوباره فیلتر به آن وصل می‌شود. در صورتی که فشار لازم برای فیلتراسیون زیاد شد، از یک فیلتر جدید استفاده کنید.

دستور کار۱۰-۸- فیلتراسیون استریل با فلاسک فیلتردار

مواد و وسایل

استریل:

فلاسک فیلتردار ۵۰۰mL... ۱

درب برای محفظه پایینی (در صورتیکه برای ذخیره سازی از این محفظه استفاده می‌شود) ۱

لوله نمونه گیری یا ظرف یونیورسال برای آزمایش استریل بودن (در صورت نیاز) ۱

غیر استریل:

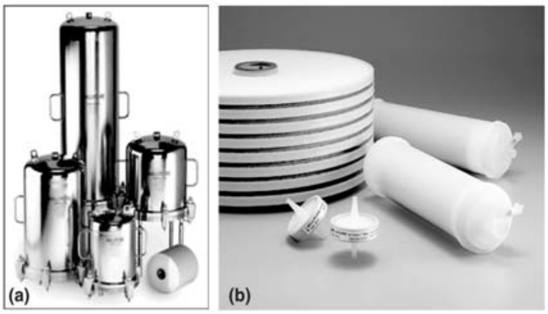
محیط کشت .... ۴۵۰mL.

پمپ خلاء یا خط خلاء

لوله ضخیم برای اتصال پمپ یا خط خلاء به فلاسک فیلتردار

دستور کار

۱- بازوی کناری فلاسک را به خط خلاء متصل کنید.



شکل ۱۰-۸: فیلتراسیون با ظرفیت بالا. (a) مخازن دارای فشار زیاد برای فیلتراسیون با فشار مثبت. (b) دیسک دسته ای و فیلترهای کارتریج تاخورده برای فیلتراسیون در مقیاس بالا.

۲- در بطری و سرپوش بالایی محفظه فلاسک فیلتردار را بردارید.
۳- محیط کشت غیراستریل را در داخل محفظه بالایی بریزید.
۴- پمپ را روشن کنید.
۵- درپوش محفظه پایینی را باز کرده آن را برای استفاده آماده کنید.
۶- وقتی که همه مایع به داخل ظرف پایینی کشیده شد، پمپ را خاموش کرده، دو محفظه را از هم جدا کنید.
۷- $10 mL$ کشت را از فلاسک پایینی به ظرف یونیورسال یا لوله مشابه انتقال دهید.
۸- فضای بالای محفظه پایینی و ظرف یونیورسال را با ۵٪ CO_2 گازدهی کنید.
۹- در محفظه پایینی و ظرف یونیورسال را ببندید.
۱۰- نام محیط کشت و تاریخ را روی هر دو ظرف یادداشت کنید.
۱۱- محفظه پایینی را تا زمان مورد نیاز در دمای $4°C$ ذخیره کنید.
۱۲- $10 mL$ نمونه موجود در ظرف یونیورسال را به مدت ۱ هفته در دمای $37°C$ انکوبه کنید و آن را از نظر آلودگی چک کنید. تا زمانیکه مشخص شود که فاقد آلودگی است از محیط کشت استفاده نشود.

ذخیره سازی

نظرات مختلفی در مورد مدت پایداری محیط‌های کشت مختلف وجود دارد. بعنوان یک راهنمای کلی، محیط‌های کشتی که فاقد گلوتامین هستند، ۹-۶ ماه در دمای $4°C$ پایدار می‌باشند. وقتی که گلوتامین، سرم یا آنتی بیوتیک‌ها به محیط کشت اضافه می‌شود، زمان ذخیره‌سازی به ۳-۲ هفته کاهش می‌یابد. بنابراین محیط‌های کشتی که حاوی اجزاء سازنده حساس می‌باشند یا باید در طی ۳-۲ هفته مصرف شده یا در دمای $-20°C$ ذخیره شوند.

بعضی از اشکال نور فلورسنت باعث می‌شود که ریبوفلاوین و تریپتوفان به محصولات جانبی سمی تبدیل شوند. بنابراین در سردخانه هایی که محیطهای کشت ذخیره می‌شوند و گرمخانه‌هایی که سلولها کشت می‌شوند باید از نور سفید استفاده شود. بطریهای محیط کشت نباید برای بیش از چند ساعت در معرض نور فلورسنت قرار گیرند. برای ذخیره سازی طولانی مدت یک فریزر تاریک توصیه می‌شود.

شکل ۹-۸: فیلترهای استریل کننده یکبار مصرف.

شکل ۱۱-۸: فیلتراسیون توسط پمپ پریستالتیک. فیلتراسیون استریل با پمپ پریستالتیک بین مخزن غیر استریل و فیلتر استریل کننده.

جدول ۴-۸: اندازه فیلتر و حجم نمونه

Filter size or designation	Disposable (D) or reusable (R)	Approximate volume that may be filtered	
		Crystalloid	Colloid
25 mm, Millex	D	1–100 mL	1–20 mL
47 mm or Sterivex cartridge	R, D	0.1–1 L	100–250 mL
90 mm	R	1–10 L	0.2–2 L
Millipak-20	D	2–10 L	200 mL–2 L
Millipak-40	D	10–20 L	2–5 L
Millipak-60	D	20–30 L	5–7 L
Millipak-100	D	30–75 L	7–10 L
Millipak-200	D	75–150 L	10–30 L
Millidisk	D	30–300 L	5–50 L
142 mm	R	10–50 L	1–5 L
293 mm	R	50–500 L	5–20 L

Examples in the table are quoted from Millipore catalog. Similar products are available from Pall Gelman, Nalge Nunc, Sartorius, and a number of other suppliers.

فصل نهم

کشت اولیه

انواع کشت های سلولی اولیه

کشت اولیه مرحله کشت بعد از جداسازی سلول ها و قبل از اولین واکشت می باشد. سه مرحله در کشت اولیه وجود دارد که باید بررسی شوند:

۱-جداسازی بافت

۲-تشریح (dissection) و یا تفکیک (disaggregation)

۳-کشت بعد از بذرافشانی در فلاسک های کشت

بعد از جداسازی ممکن است با مهاجرت سلول ها از قطعات بافت متصل به بستر مناسب یا با تفکیک مکانیکی یا آنزیمی بافت، برای تولید یک سوسپانسیون سلولی، یک کشت سلولی اولیه بوجود آید که در نهایت تعدادی از سلول ها به بستر خواهند چسبید. به نظر می رسد که برای اکثر سلول های ترانسفورم نشده طبیعی به استثنای سلولهای خونساز، لازم است به یک سطح صاف چسبیده تا با حداکثر راندمان زنده مانده و تکثیر یابند. از سوی دیگر، سلول های ترانسفورم شده، مخصوصاً سلول های تومورهای حیوانی قابل کشت (transplantable tumors) اغلب قادر به تکثیر در حالت معلق می باشند.

آنزیم های مورد استفاده متداول، نمونه های خام تریپسین، کلاژناز، الاستاز، پروناز، دیسپاز، DNase و هیالورونیداز به تنهایی یا به صورت ترکیب های مختلف می باشند. نمونه های خام اغلب موفقیت آمیزتر از نمونه های آنزیمی خالص شده می باشند، چرا که نمونه خام پروتئازهای دیگر به صورت آلوده کننده بوده هرچند نمونه های خالص از لحاظ فعالیت عموماً کمتر سمی و بیشتر اختصاصی می باشند. تریپسین و پروناز، بیشترین تفکیک کامل را می دهند اما ممکن است به سلول ها آسیب برسانند. کلاژناز و دیسپاز، تفکیک ناکامل داده اما کمتر مضر می باشند. هیالورونیداز می تواند به همراه کلاژناز برای هضم ماتریکس داخل سلولی استفاده شود و DNase برای پراکنده کردن DNA آزاد شده از سلول های لیز شده به کار می رود، چون منجر به پروتئولیز ناقص شده و تجمع مجدد را افزایش می دهد.

هرچند ممکن است هر بافت نیازمند مجموعه مختلفی از شرایط باشد، اغلب کشت های اولیه نیازهای مشترکی دارند:

۱-بهتر است بافت چربی و بافت مرده در طی تشریح برداشته شود.

۲-بافت باید با دقت با وسایل تند خرد شده تا حداقل آسیب ایجاد شود.

۳-آنزیم های مورد استفاده برای تفکیک باید بعداً با سانتریفوژ ملایم خارج شوند.

۴-غلظت سلول ها در کشت اولیه باید خیلی بیشتر از مقداری باشد که معمولاً برای واکشت استفاده می شود، چون نسبت سلول هایی از بافت که در کشت اولیه زنده می مانند ممکن است کاملاً کم باشد.

۵-یک محیط کشت غنی، مثل Ham's F12 بر محیط کشت های ساده مثل Eagle's MEM ترجیح داده می شود و اگر به سرم نیاز باشد، سرم جنین گاو اغلب میزان بقاء بیشتری از سرم گوساله یا اسب می دهد. جداسازی انواع سلولی خاص احتمالاً نیازمند محیط های کشت انتخابی خواهد بود.

۶-بافت جنینی ترجیح داده می شود، چون به آسانی تفکیک شده، سلول های زنده بیشتری داده و در کشت اولیه بسیار سریعتر از بافت بالغ تکثیر می یابد.

جداسازی بافت

قبل از شروع کار با بافت انسانی یا حیوانی، مطمئن شوید تا کار شما با قوانین اخلاق پزشکی یا قوانین جاری مربوط به آزمایش بر روی حیوانات سازگار می باشد.

نکته ایمنی) کار با بافت انسانی باید در یک هود کلاس II انجام شود.

اگر احتمال آلودگی جایگاه تشریح وجود دارد، آن را با الکل ٪۷۰ استریل کنید(مثلاً پوست). بافت را به صورت سترون خارج کرده و آن را در کمترین زمان ممکن در BSS یا محیط کشت قرار داده و به آزمایشگاه کشت بافت انتقال دهید. حیوانات را در آزمایشگاه کشت بافت تشریح نکنید، چون ممکن است حیوانات آلودگی میکروبی داشته باشند. اگر تأخیر در انتقال بافت غیر قابل اجتناب باشد، می توان بافت را تا ۷۲ ساعت در دمای ۴ °C نگهداری کرد، هرچند با انتقال سریعتر راندمان بهتری حاصل می شود.

جنین موش

جنین های موش یک منبع سلولی مناسبی برای کشت فیبروبلاستی تمایز نیافته می باشند. آنها اغلب به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده می شوند.

دستور کار ۱-۹- جداسازی جنین های موش

طرح کلی

رحم موش حامله که از لحاظ زمانی برنامه ریزی شده را به صورت سترون خارج کرده و جنین ها را خارج کنید.

مواد

استریل:

DBSS: BSS تشریح (BSS با غلظت بالای آنتی بیوتیک) در لوله در پیچ دار یا ظرف یونیورسال ۲۵-۵۰ mL

BSS در بشر استریل۵۰ mL برای خنک کردن وسایل پس از شعله دهی

پتری دیش ۹cm

پنس های نوک دار

قیچی های نوک دار

غیر استریل:

هود لامینارفلو کوچک

موش حامله

الکل ٪۷۰ در بطری شستشو

الکل ٪۷۰ برای استریل کردن وسایل

چراغ بونزن

نکته ایمنی) وقتی که وسایل را با فرو بردن در الکل و سپس گرفتن آنها روی شعله استریل می کنید، مراقب باشید تا وسایل را هنگامی که هنوز شعله ور می باشند به داخل الکل باز نگردانید.

دستور کار

۱-**القاء فحلی (Induction of estrus)** : اگر موش های نر و ماده از همدیگر جدا می باشند وقتی که برای جفت گیری در کنار هم قرار می گیرند، سه روز بعد فحلی در ماده القاء خواهد شد، زمانیکه حداکثر تعداد جفت گیری های موفق اتفاق خواهد افتاد. این فرآیند، تولید با برنامه جنین را در زمان مناسب امکان پذیر می سازد. برای برنامه ریزی زمانی موفق آمیزشی، ممکن است هر روز صبح واژن موش های ماده از لحاظ پلاگ موکوسی(mucous plug) سفت بررسی شود.

۲-**تاریخ گذاری جنین ها(Dating the embryos)** : روز تشخیص یک پلاگ واژنی (vaginal plug) به عنوان روز صفر در نظر گرفته می شود و تکامل جنین ها از این تاریخ برنامه ریزی می شود.

دوره کامل حدود ۲۱-۹ روز می باشد. سن بهینه برای تهیه کشت هایی از یک جنین تفکیک شده در حدود روز ۱۳ بوده که زمانی است که جنین نسبتاً بزرگ بوده اما هنوز حاوی نسبت بالایی از مزانشیم تمایز نیافته است که منبع اصلی کشت می باشد. هرچند جداسازی و دستکاری جنین ها در این مرحله در انگلستان نیاز به مجوز داشته و بنابراین ممکن است ترجیح داده شود از جنین های ۹ یا ۱۰ روزه استفاده شود، هرچند میزان بافت بازیابی شده از این جنین های اساساً کم خواهد بود.

اغلب اندام های اختصاصی، به استثنای مغز و قلب در حدود روز نهم حاملگی شروع به تشکیل شدن می کنند اما جداسازی آنها تا روز حدود یازدهم مشکل می باشد. تشریح در روز ۱۴-۱۳ آسانتر بوده و اغلب اندام ها تا روز هیجدهم کاملاً تشکیل شده اند.

۳-موش را با قطع گردن کشته و سطح شکمی را به اندازه کافی با الکل ٪۷۰ سواب کنید.

۴-پوست ناحیه شکم را به صورت متقاطع در خط میانی درست بالای دیافراگم پاره کنید و پوست دو طرف ناحیه شکافت را در جهات مختلف بکشید.

۵-با قیچی استریل در امتداد خط میانی شکمی برش داده تا احشاء داخلی آشکار شوند. در این مرحله رحم پر شده با جنین ها در حفره شکمی خلفی آشکار می باشد.

۶-رحم را در یک لوله در پیچ دار ۲۵ mL یا ۵۰mL ، حاوی ۱۰ یا ۲۰mL از DBSS تشریح کنید.

نکته) تمام مراحل قبلی باید در خارج از آزمایشگاه کشت بافت صورت پذیرد؛ یک هود لامینارفلوکوچک و تکنیک سریع به حفظ استریلیتی کمک می کند. حیوانات زنده را به آزمایشگاه کشت بافت نبرید، چون ممکن است حیوانات حامل آلودگی باشند. اگر یک لاشه حیوان باید در داخل آزمایشگاه کشت بافت دستکاری شود، مطمئن شوید تا لاشه به صورت مختصر در الکل غوطه ور شده یا به طور کامل سواب شده است و بلافاصله پس از استفاده آن را دور بیاندازید.

۷-رحم کامل را به آزمایشگاه کشت بافت برده آنها را به یک دیش تازه از DBSS استریل انتقال دهید.

۸-جنین ها را تشریح کنید.

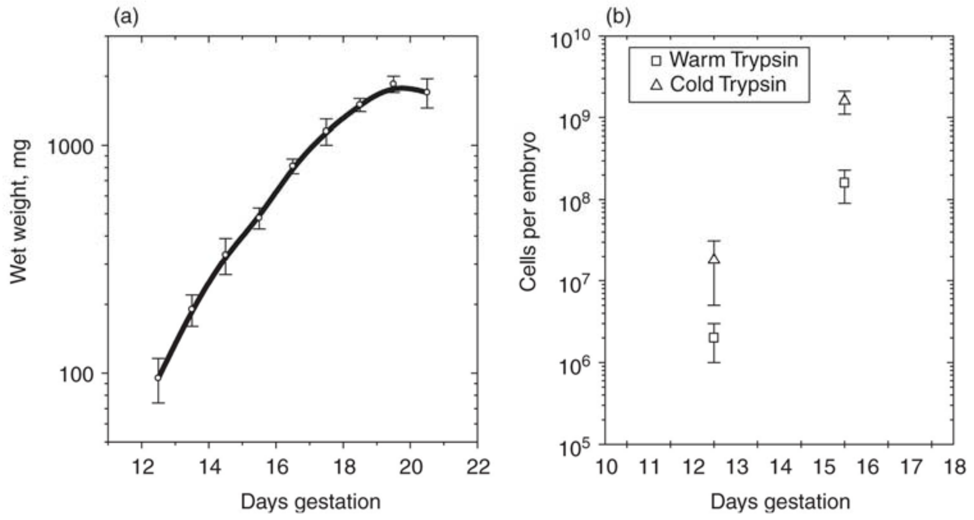
a) رحم را با دو جفت پنس استریل پاره کرده، نوک پنس ها را نزدیک هم نگه داشته تا از کشیده شدن رحم و فشار زیاد به جنین ها جلوگیری شود.

b) جنین ها را از غشا و جفت آزاد کرده و آنها را در یک طرف دیش قرار داده تا خون آنها گرفته شود.

۹-جنین ها را به یک دیش تازه انتقال دهید. اگر به تعداد زیادی جنین نیاز می باشد ممکن است بهتر باشد که دیش را بر روی یخ قرار دهید.

جنین جوجه

تشریح جنین های جوجه راحت تر است زیرا آنها در همان مرحله از جنین موش بزرگتر می باشند. شبیه جنین های موش، جنین های جوجه به طور متداول برای تهیه کشت های اولیه سلول های مزانشیمی، برای تجزیه و تحلیل تکثیر سلولی، برای تهیه لایه های تغذیه کننده و به عنوان یک بستر برای تکثیر ویروس ها استفاده می شوند. همچنین به دلیل اندازه بزرگ آن، تشریح اندام های اختصاصی برای تولید انواع سلول های اختصاصی از قبیل هپاتوسیت ها، عضله قلبی و اپی تلیوم ریه آسانتر می باشد. همانند جنین های موش، استفاده از جنین های جوجه در انگلستان شامل قانون حیوانات بوده و کار کردن با جنین هایی که بیش از نیمی از دوران جنینی را طی کرده اند نیازمند مجوز می باشد.



شکل ۱-۹: وزن مرطوب کل و راندمان سلولی به ازای هر جنین موش. (a) وزن مرطوب کل جنین بدون جفت و غشاها، میانگین± انحراف معیار. (b) راندمان سلولی به ازای هر جنین بعد از انکوباسیون در تریپسین ٪۰/۲۵ در دمای ۳۷°C به مدت ۴ ساعت بدون هیچ گونه مرحله جمع آوری حد واسط(مربع ها) یا بعد از غوطه ور کردن در تریپسین ٪۰/۲۵ در دمای ۴°C به مدت ۵ ساعت و انکوباسیون در دمای ۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه(مثلث ها).

دستور کار۲-۹- جداسازی جنین های جوجه

طرح کلی

جنین را در شرایط سترون از تخم مرغ خارج کرده و به داخل دیش منتقل کنید.

مواد

استریل:

DBSS: BSS تشریح(با غلظت بالای آنتی بیوتیک) در لوله در پیچ دار یا ظرف یونیورسال ۵۰-۲۵ mL

BSS ، ۵۰ mL در یک بشر استریل(برای خنک کردن وسایل پس از شعله دهی)

بشر کوچک، ۲۰-۵۰mL یا ظرف مخصوص تخم مرغ (egg cup)

پنس راست و خمیده

پتری دیش های ۹cm

غیر استریل:

الکل ٪۷۰

سواب

تخم های جنین دار ۱۰ روزه

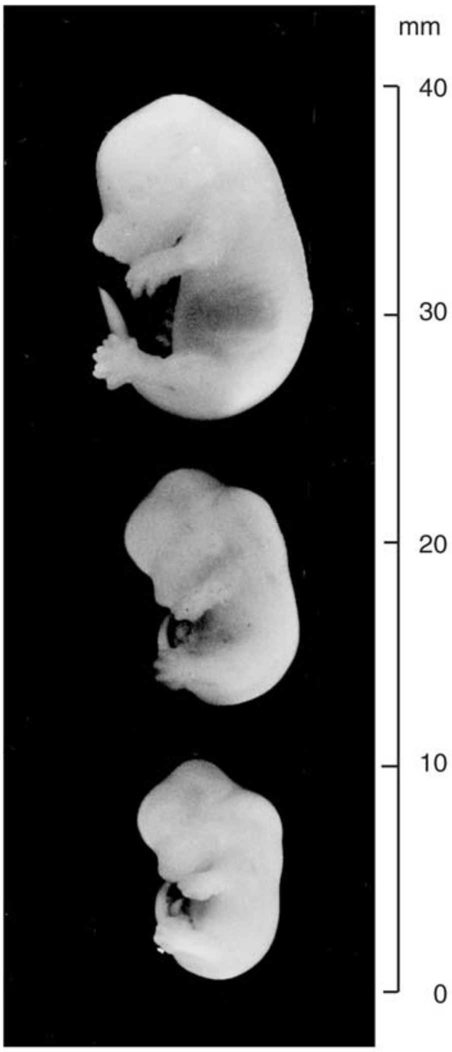
انکوباتورهای مرطوب (بدون CO_2 اضافی بالاتر از سطح اتمسفری)

دستور کار

۱- تخم مرغ ها را در درجه حرارت ۳۸/۵ °C در یک اتمسفر مرطوب انکوبه کرده و هر روز تخم مرغ ها را ۱۸۰ درجه بچرخانید. هر چند تخم مرغ ها در حدود روز ۲۱-۲۰ جوجه گیری می شوند، طول مراحل تکاملی آنها با موش متفاوت می باشد. برای کشت سلولهای پراکنده از کل جنین، تخم مرغ باید در حدود روز ۸ و برای تهیه تکه های اندام در حدود روز ۱۳-۱۰ برداشته شود.

۲- تخم مرغ را با الکل ٪۷۰ سواب کرده و آن را به صورتی که انتهای پهن آنها به سمت بالا باشد در یک بشر کوچک قرار دهید.

۳- با استفاده از یک پنس استریل بالای پوسته تخم مرغ را شکسته و پوست را تا لبه کیسه هوایی بکنید.



شکل ۲-۹: جنین های موش. جنین ها ۱۲، ۱۳ و ۱۴ روز پس از بارداری. جنین ۱۲ روزه(پایین) از یک زایمان کوچک(۳ تا) حاصل شده و بزرگتر از اندازه ای است که معمولاً در این مرحله یافت می شوند.

۴- پنس را دوباره استریل کرده (یعنی در الکل فرو برده و سر پنس را روی شعله گرفته و کل آن را در BSS استریل خنک کنید) و سپس با استفاده از پنس، غشای پوسته سفید را کنده تا غشای کوریوالانتوئیک (CAM) زیر آن با عروق خونی آن آشکار شود.

۵- CAM را با استفاده از پنس خمیده استریل سوراخ کرده و با گرفتن ملایم، قسمت زیر سر جنین را بلند کنید. دو طرف پنس را زیاد به هم فشار ندهید چون گردن جنین قطع خواهد شد.

۶- جنین را به یک پتری دیش ۹ cm حاوی ۲۰ mL از DBSS انتقال دهید.

مواد بیوپسی انسان

کار کردن با مواد بیوپسی انسان، مشکلاتی را به همراه دارد که در مورد بافت حیوانی وجود ندارد. معمولاً نیاز به اخذ رضایت از :

۱- کمیته اخلاقی بیمارستان ۲- پزشک یا جراح مربوطه ۳- بیمار یا بستگان بیمار وجود دارد. بعلاوه، معمولاً نمونه برداری بیوپسی برای مقاصد تشخیصی انجام می شود و بنابراین باید در ابتدا، نیازهای آسیب شناس برآورده شود. این عامل در مورد بافتهای جدا شده در عمل جراحی یا بافت غیرپاتولوژیک (مثل جفت یا بند ناف) مشکلات کمتری دارد.

دستور کار۳-۹- بیوپسی های انسان

طرح کلی

با کارکنان بیمارستان مشورت کرده، ظرف(های) برچسب دار حاوی محیط کشت تهیه کرده و ترتیب دریافت نمونه ها از اتاق جراحی یا آسیب شناس را بدهید.

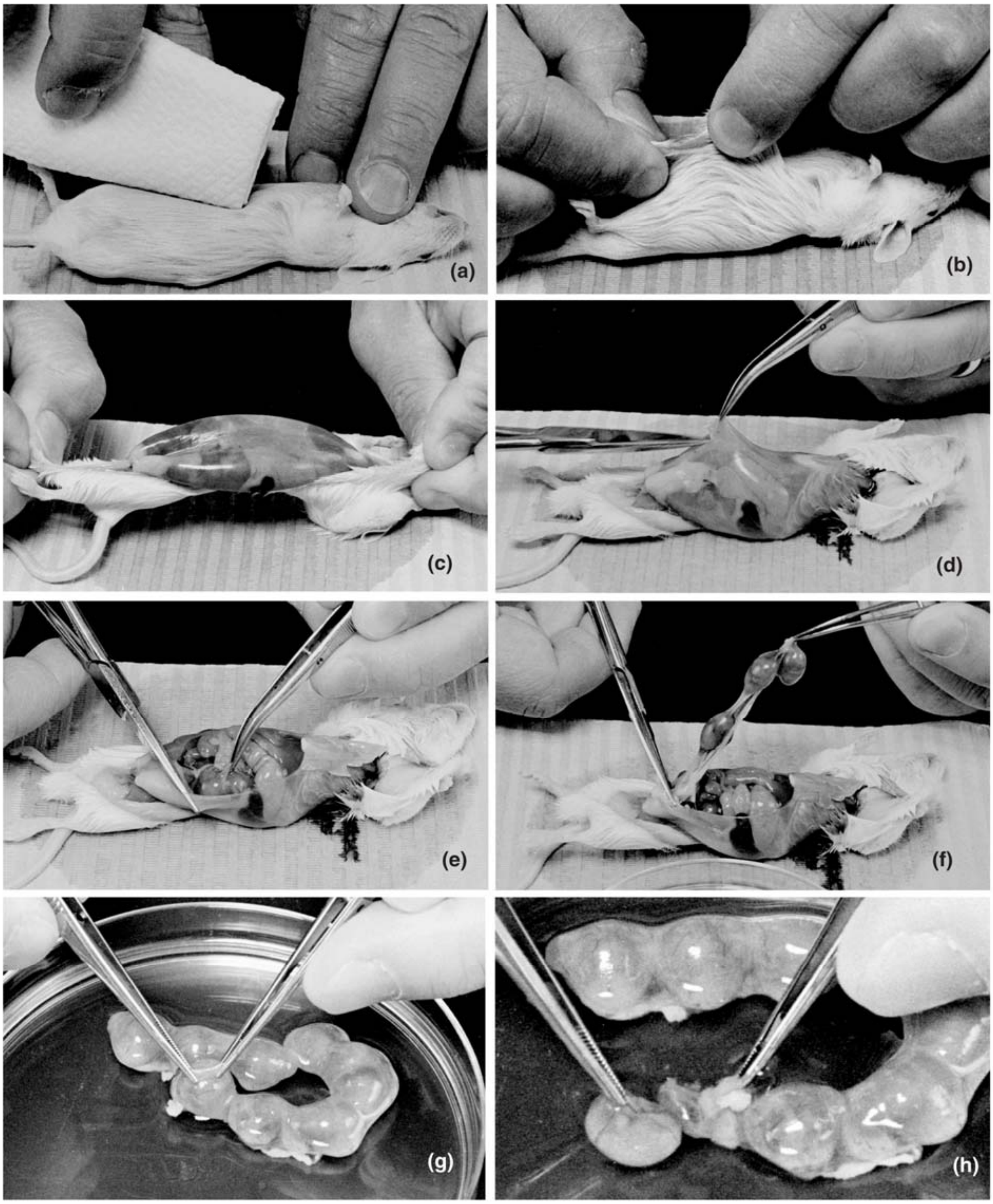
مواد

لوله های نمونه(۱۵-۳۰mL) با درپوش های ضد نشت که تا حدود نیمی از لوله با محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک پر شده و آدرس و شماره تلفن شما بر روی آن یادداشت شده است را تهیه کنید.

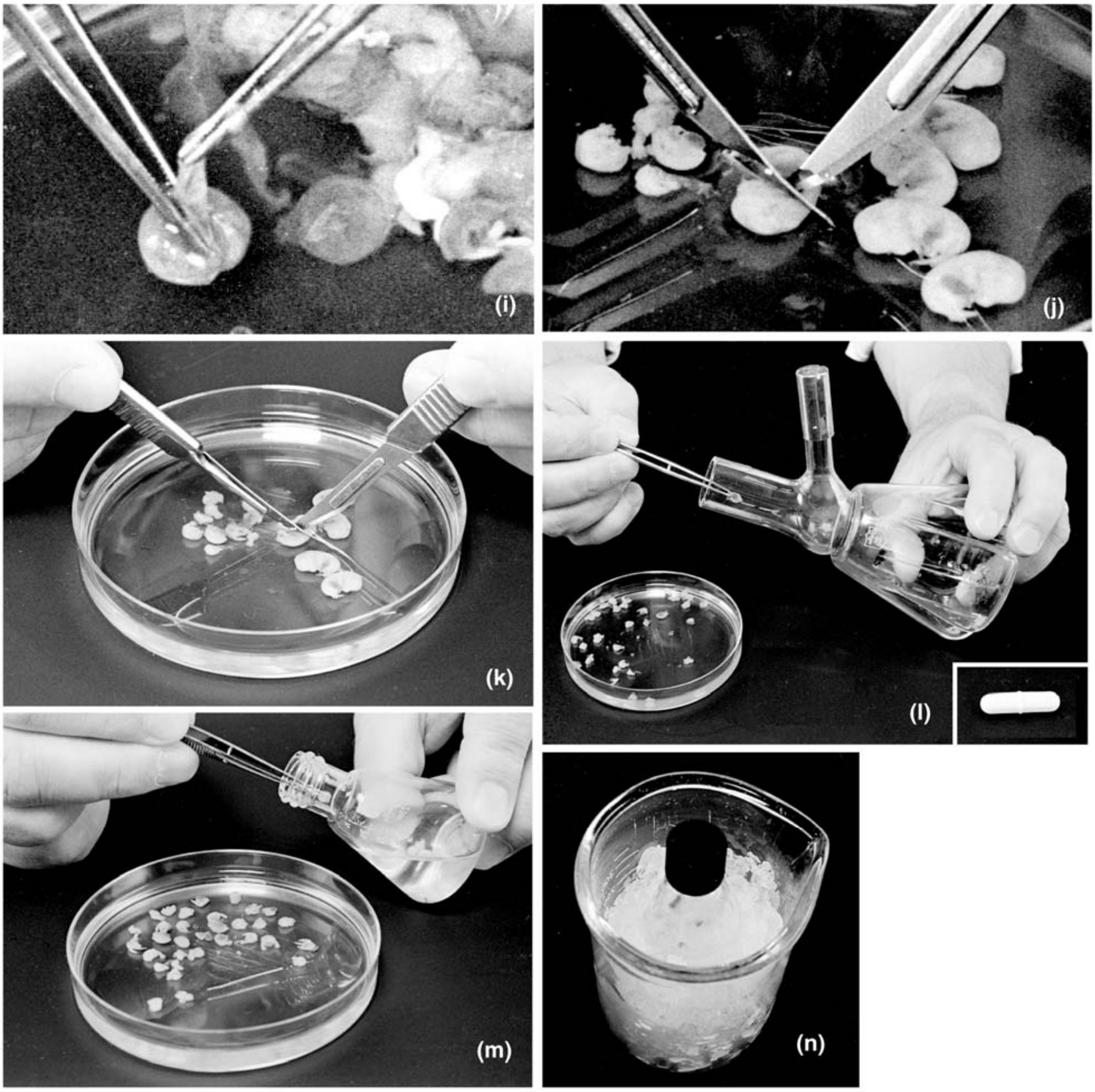
دستور کار

۱- ظروف حاوی محیط کشت دریافت نمونه که به طور واضح علامت گذاری شده اند را برای اتاق انتظار اتاق عمل جراحی یا آزمایشگاه آسیب شناسی تهیه کنید.

۲- ترتیبی دهید تا وقتی که مواد برای دریافت نمونه آماده شد به شما اطلاع داده شود.



شکل ۳-۹: تشریح موش. مراحل تشریح یک موش حامله برای جمع آوری جنین ها. (a) سواب کردن شکم. (b) و (c) پاره کردن پوست تا دیواره شکمی آشکار شود. (d) باز کردن شکم. (e) آشکار کردن رحم در محل خود. (f) خارج کردن رحم. (g) تشریح جنین ها از رحم. (i) خارج کردن غشاها. (j) برداشتن سر(اختیاری). (k) تکه تکه کردن جنین ها. (l) انتقال قطعات به فلاسک مخصوص تریپسینه کردن. (m) انتقال قطعات به یک فلاسک ارلن مایر کوچک(برای تریپسینه کردن گرم). (n)قرار دادن فلاسک بر روی یخ(برای تریپسینه کردن سرد).

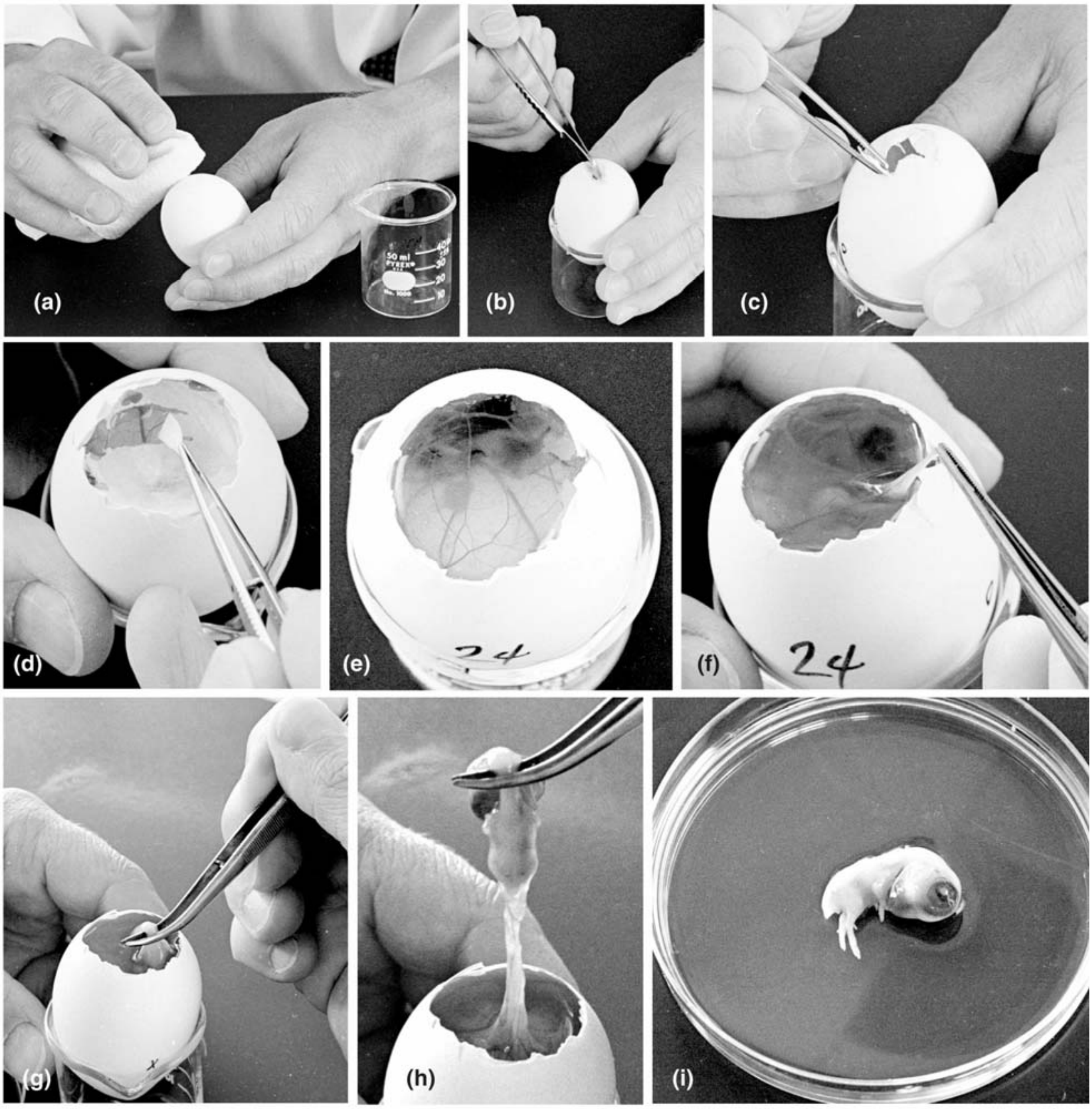


شکل ۳-۹:(ادامه)

۳- ظروف را بعد از جراحی جمع آوری کرده یا باید فردی بلافاصله آنها را پس از دریافت برای شما بفرستد و وقتی که فرستاده شدند شما را مطلع سازد.

۴- نمونه را با آزمایشگاه کشت بافت منتقل کنید. نمونه باید سه مرتبه پوشانده شود (مثلاً در یک لوله مهر و موم شده در داخل یک کیسه پلاستیکی مهروموم شده پر از پارچه جاذب رطوبت، در صورت نشتی، در داخل یک پاکت باد کرده که نام، آدرس و شماره تلفن شما بر روی آن درج شده است). معمولاً اگر نمونه های بیوپسی در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگهداری شوند، برای حداقل ۲۴h و حتی تا ۴-۳ روز زنده می مانند؛ هرچند هرقدر فاصله زمانی بین جراحی تا کشت زیادتر شود نمونه ها بیشتر رو به زوال خواهند رفت.

۵- رسید نمونه را در یک دفتر یادداشت روزانه ثبت کرده تا بعداً وارد کامپیوتر کنید.



شکل۴-۹: خارج کردن یک جنین جوجه از تخم مرغ. مراحل خارج کردن جنین کامل جوجه از یک تخم مرغ. (a)سواب کردن تخم مرغ با الکل. (b)شکستن پوسته (c) کندن پوسته(d) کندن غشای پوسته. (e)آشکار شدن غشاء کوریوالانتوئیک (CAM) و عروق خونی. (f)خارج کردن CAM توسط پنس. (g) گرفتن اطراف گردن جنین. (h) خارج کردن جنین از تخم مرغ. (i)جنین ۱۰ روزه در داخل پتری دیش.

۶- **آلودگی زدایی:** قبل از بیوپسی پوست یک شستشو با محلول ضدعفونی کننده صورت گرفته و قبل از جراحی روده یک آنتی بیوتیک خوراکی داده می شود. هرچند به دلیل نیازهای جراحی، اغلب نمونه های جراحی وقتی برداشته می شوند استریل می باشند و مشکلات احتمالی ممکن است با دستکاری های بعدی ایجاد شود. نمونه های سطحی(مثل بیوپسی های پوست، ملانوماها و غیره) و نمونه های دستگاه معده ای روده ای (مثل نمونه های کولون و رکتال) مخصوصاً مستعد به آلودگی از فلور روده می باشند. ممکن است مشورت با یک میکروب شناس

پزشکی برای تعیین فلور میکروبی یک نمونه بافت و سپس انتخاب صحیح آنتی بیوتیک بر حسب آن مفید باشد. اگر نمونه جراحی به اندازه کافی بزرگ باشد(یعنی ۲۰۰ mg یا بیشتر) فرو بردن مختصر (یعنی ۳۰ ثانیه تا ۱ دقیقه) در الکل ۷۰٪ به کاهش آلودگی سطحی بدون این که آسیب زیادی به مرکز نمونه بافت برساند، کمک خواهد کرد.

کشت اولیه

چندین تکنیک برای کشت اولیه از بافت جدا شده ابداع شده است. این تکنیک ها را می توان به ۱) تکنیک های کاملاً مکانیکی و ۲) تکنیک هایی که از تفکیک آنزیمی استفاده می کنند، تقسیم کرد. اکسپلنت اولیه برای مقادیر بسیار کم بافت مناسب است. تفکیک آنزیمی زمانی که بافت بیشتری در دسترس می باشد، محصول بیشتری می دهد و تفکیک مکانیکی در مورد بافت های نرم و بعضی بافت های سفت تر وقتی که اندازه محصول زنده مهم نیست به خوبی کار می کند.

اکسپلنت اولیه

تکنیک اکسپلنت اولیه روشی ابتدایی بوده که توسط Harrison ،Carrell و افراد دیگر برای شروع یک کشت بافت توسعه پیدا کرد. همانگونه که در ابتدا انجام می شد یک تکه از بافت را در لنف یا پلاسمای خون فرو برده، با سرم غیر متجانس و عصاره جنین مخلوط کرده و بر روی یک لامل که بر روی یک لام مقعر وارونه شده است قرار می دهیم. پلاسمای لخته شده بافت را در جای خود نگهداشته و اکسپلنت را می توان با یک میکروسکوپ معمولی بررسی کرد. عصاره جنین و سرم به اضافه پلاسما، مواد غذایی را فراهم ساخته و مهاجرت به خارج از اکسپلنت، در عرض بستر جامد را تحریک می کند. سرم غیر متجانس برای افزایش لخته شدن پلاسما استفاده می شود. این تکنیک ها هنوز استفاده می شود، اما به میزان زیادی روش ساده تر آن که در دستور کار زیر شرح داده می شود، جایگزین آن شده است.

دستور کار۴-۹- اکسپلنت اولیه

طرح کلی

بافت به دقت خرد شده و شستشو داده می شود و تکه ها در سطح یک فلاسک کشت یا پتری دیش در حجم کمی از محیط کشت با غلظت بالایی از سرم(یعنی ۵۰٪-۴۰) بذرافشانی می شوند به طوری که کشش سطحی، تکه ها را تا زمانی که آنها به طور خود به خود به سطح متصل می شوند در جای خود نگه می دارد. معمولاً زمانی که این امر صورت پذیرفت برون رشد (outgrowth)سلول ها آغاز خواهد شد.

مواد

استریل:

محیط کشت (مثلاً DMEM: F12 به نسبت ۵۰:۵۰ با ۲۰٪ FBS)

DBSS ۱۰۰ mL

پتری دیش ۹ cm که مخصوص کشت بافت نمی باشد

پنس

اسکالپل

پی پت ۱۰mL دهان گشاد

لوله های سانتریفوژ ۱۵ یا ۲۰ mL یا ظروف یونیورسال

فلاسک های کشت ۲۵ cm^2 یا پتری دیش های ۵-۶ cm با گرید کشت بافت. اندازه فلاسک ها و حجم محیط کشت رشد به مقدار بافت بستگی دارد. تقریباً پنج فلاسک ۲۵ cm^2 برای هر ۱۰۰ mg بافت.

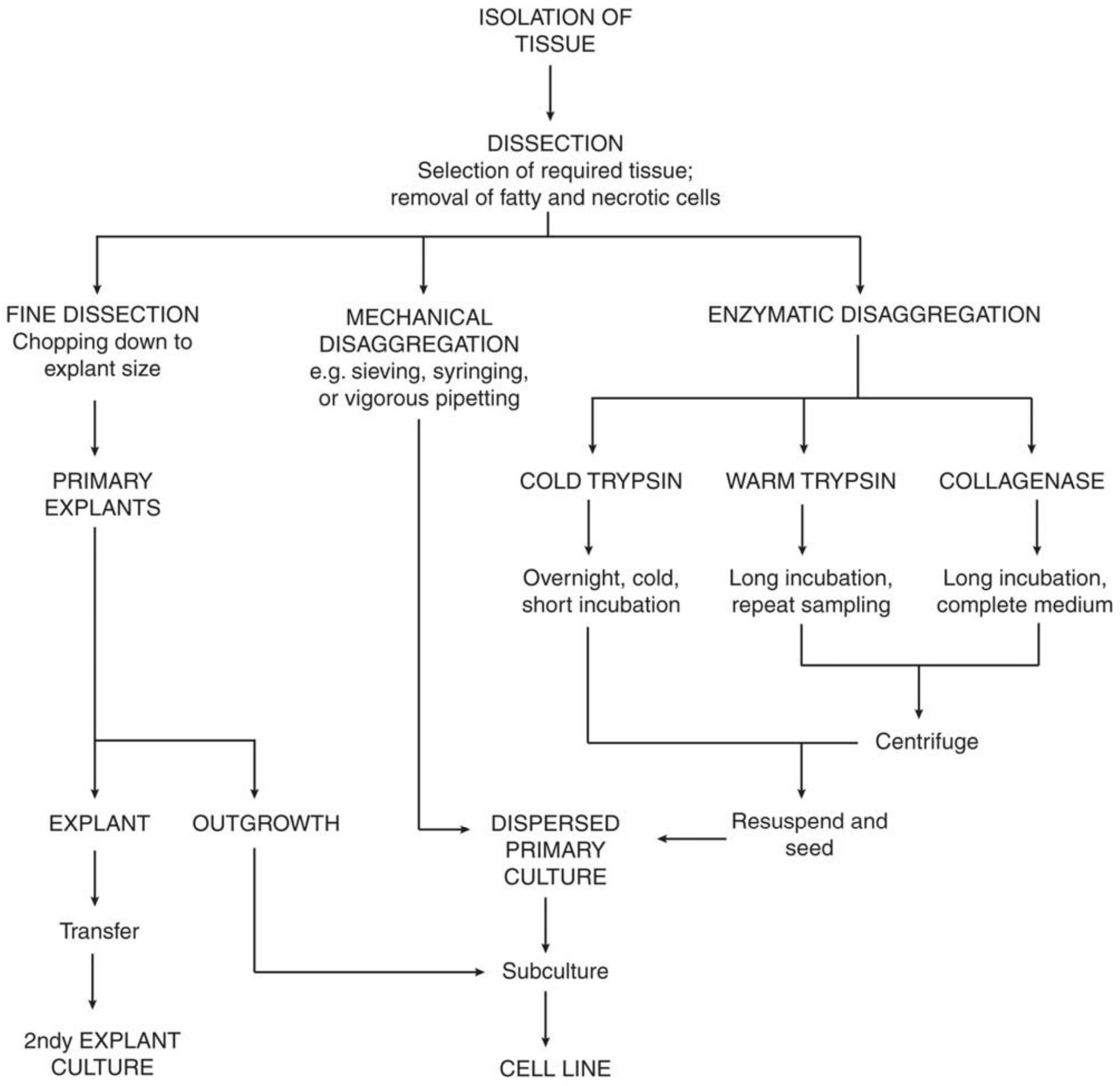
دستور کار

۱- بافت را به BSS تازه و استریل انتقال داده و شستشو دهید.

۲- بافت را به یک دیش دیگر منتقل کرده، بافت های ناخواسته مثل چربی یا مواد مرده را جدا کرده مجدداً وارد دیش سوم کنید.

۳- با اسکالپل های صلیبی با دقت آن را به قطعات ۱ mm خرد کنید.

۴- با استفاده از پی پت (۱۰-۲۰ mL دهان گشاد) قطعات را به یک لوله سانتریفوژ یا ظرف یونیورسال استریل ۱۵ یا



شکل ۵-۹: روش های کشت اولیه. مسیرهای متعدد به دست آوردن یک رده سلولی؛ مرکز و سمت چپ توسط تفکیک مکانیکی، سمت راست توسط تفکیک آنزیمی. یک اکسپلنت را می توان انتقال داد تا رشد کرده و سپس برون رشد حاصل را واکشت داد تا یک رده سلولی حاصل شود.

۵۰ mL انتقال دهید(ابتدا داخل پی پت را با BSS مرطوب کنید تا قطعات به پی پت نچسبند).

۵- اجازه دهید که قطعات ته نشین شوند.

۶- با تعلیق مجدد قطعات در BSS آنها را شستشو دهید، اجازه دهید تکه ها ته نشین شده و مایع سوپرناتانت را خارج کنید. این مرحله را دو بار دیگر تکرار کنید.

۷- قطعات را به میزان حدود ۳۰-۲۰ تکه در هر فلاسک ۲۵ cm^2 به یک فلاسک کشت انتقال دهید(به خاطر داشته باشید که پی پت را مرطوب کنید).

۸- بیشتر مایع را خارج کرده و در حدود ۱ mL محیط کشت رشد به ازای هر ۲۵ cm^2 سطح رشد اضافه کنید. فلاسک

را به آرامی کج کرده تا قطعات به صورت یکنواخت در سطح رشد منتشر شوند.

۹- در فلاسک را بسته و آن را به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در یک انکوباتور یا گرمخانه در دمای $37\ ^{\circ}C$ قرار دهید.

۱۰- اگر قطعات اتصال یافتند ممکن است به تدریج حجم محیط کشت در طی ۵-۳ روز به ۵ mL در هر فلاسک ۲۵ cm^2 افزایش یابد و سپس هفته ای یک بار تعویض شده تا زمانی که برون رشد قابل ملاحظه ای از سلول ها مشاهده شود.

۱۱- هنگامی که یک برون رشد تشکیل شد ممکن است سپس اکسپلنت با یک اسکالپل جدا شده و با استفاده از یک پی پت که قبلاً مرطوب شده است به یک ظرف کشت جدید انتقال یابد(سپس به مرحله ۷ باز گردید).

۱۲- محیط کشت فلاسک اول را تا زمانی که برون رشد، حداقل ٪۵۰ از سطح رشد را بپوشاند، تعویض کنید. در این مرحله ممکن است سلول ها واکشت داده شوند.

این تکنیک مخصوصاً برای مقادیر کم بافت از قبیل بیوپسی های پوست که خطر از دست رفتن سلول ها در طی تفکیک مکانیکی یا آنزیمی زیاد است، مفید می باشد. عیب این روش به خاطر قدرت اتصال ضعیف بعضی از بافت ها و انتخاب سلول ها در برون رشد می باشد. هر چند در عمل، اغلب سلول ها مثل سلول های جنینی به طرز موفقیت آمیزی به بیرون مهاجرت می کنند.

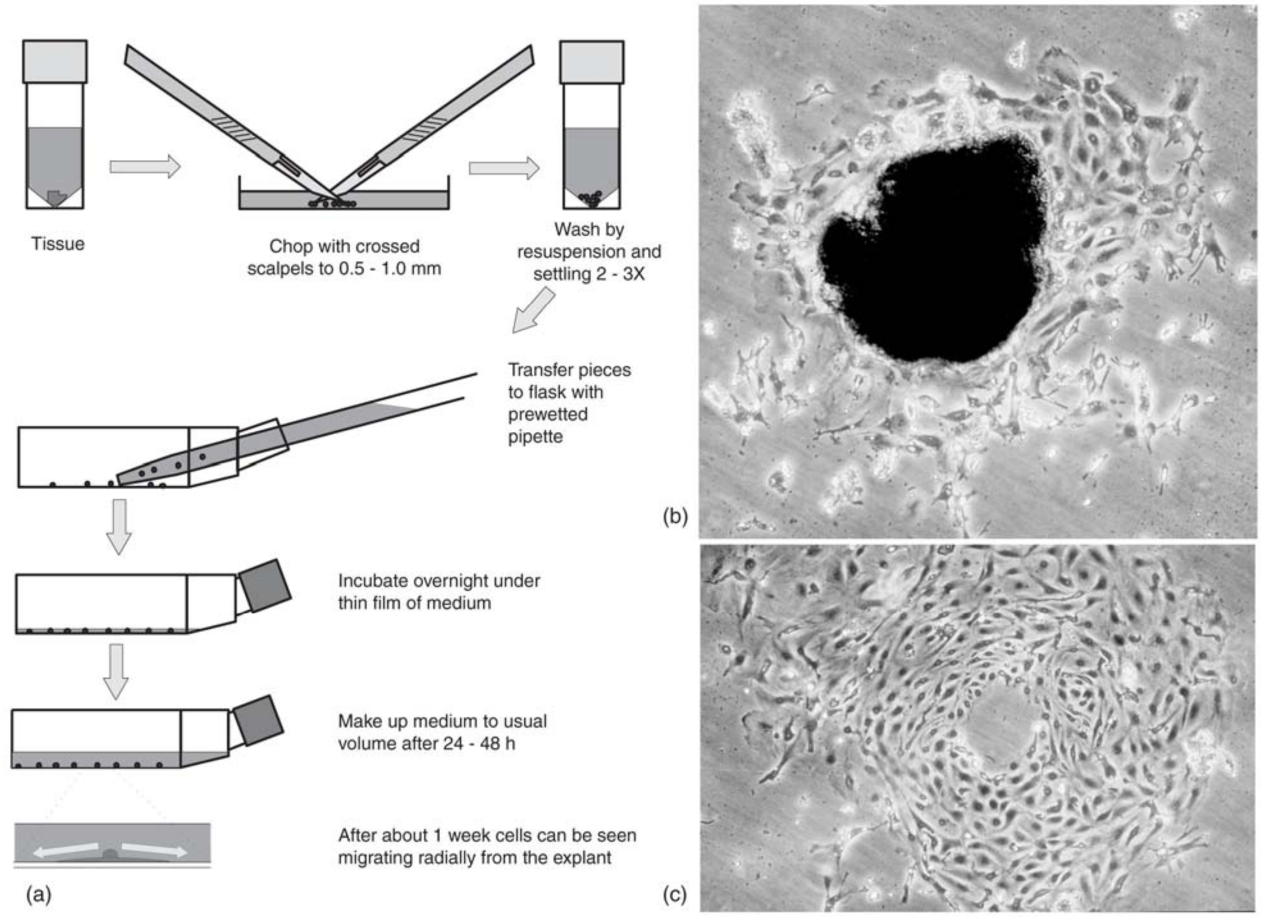
اکسپلنت های چسبنده: با قرار دادن یک لامل شیشه ای بالای اکسپلنت به طوریکه اکسپلنت نزدیک لبه لامل قرار گیرد، هم اتصال و هم مهاجرت ممکن است تحریک شود یا ممکن است دیش پلاستیکی خراشیده شده تا بافت به فلاسک متصل شود. همچنین ممکن است با تیمار پلاستیک با پلی لیزین یا فیبرونکتین، ماتریکس خارج سلولی یا لایه های تغذیه کننده، اتصال افزایش یابد. در گذشته لخته های پلاسما برای افزایش اتصال استفاده می شده است. یک قطره از پلاسما را روی سطح پلاستیکی قرار داده و اکسپلنت را در آن قرار دهید. این کار باید پلاسما را تحریک کرده که در عرض چند دقیقه لخته شود، سپس می توان روی آن محیط کشت را اضافه کرد. همچنین می توان از فیبرونکتین و ترومبین خالص سازی شده هم استفاده کرد.

تفکیک آنزیمی

اتصال سلول – سلول در بافت ها توسط انواع مولکول های اتصال سلولی یا CAMs انجام می شود ، که تعدادی از آنها وابسته به کلسیم(کدهرین ها) می باشند و بنابراین نسبت به عوامل کلاته کننده از قبیل EDTA یا EGTA حساس می باشند. اینتگرین هایی که به واحد آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید (RGD) در ماتریکس خارج سلولی متصل می شوند، دارای نواحی متصل شونده به Ca^{2+} بوده و با حذف Ca^{2+} تحت تأثیر قرار می گیرند. همچنین ماتریکس داخل سلولی و غشاهای پایه دارای گلیکوپروتئین های دیگر از قبیل فیبرونکتین و لامینین می باشند که حساس به پروتئاز بوده و پروتئوگلیکانها که کمتر حساس به پروتئاز می باشند ولی گاهی اوقات می توان با گلیکانازهایی مثل هیالورونیداز یا هپاریناز آنها را تجزیه کرد. به طور کلی افزایش خلوص یک آنزیم کنترل باعث سمیت کمتر و افزایش اختصاصیت می شود اما ممکن است منجر به فعالیت تفکیک کمتر شود.

تفکیک مکانیکی و آنزیمی بافت، مشکل انتخاب به وسیله مهاجرت را مرتفع کرده و تعداد بیشتری از سلول ها (که بیشتر معرف کل بافت می باشند) در زمان کوتاهتری حاصل می شود. هرچند همان گونه که در تفکیک اکسپلنت اولیه، انتخاب بر اساس مهاجرت سلولی می باشد، تکنیک های جداسازی، سلول های مقاوم به پروتئاز و استرس مکانیکی را انتخاب خواهد کرد.

بافت جنینی آسانتر پراکنده شده و محصول بیشتری از سلول های در حال تکثیر را نسبت به بافت نوزاد یا بالغ می دهد. افزایش دشواری در به دست آوردن سلول های در حال تکثیر زنده با افزایش یافتن سن به دلیل چندین عامل می باشد که شامل: آغاز تمایز، افزایش در بافت همبند رشته ای و ماتریکس خارج سلولی و کاهش مخزن سلولی در حال تکثیر تمایز نیافته می باشد. وقتی که به روش های شدیدتر برای تفکیک بافت نیاز باشد(مثلاً تریپسینه کردن طولانی تر یا همزنی



شکل ۶-۹: کشت اکسپلنت اولیه. (a) شکل شماتیک مراحل تشریح و بذرافشانی اکسپلنت های اولیه. (b) کشت اکسپلنت اولیه از کارسینومای پوست فلسی موش؛ اکسپلنت و مرحله ابتدایی برون رشد حدود ۳ روز بعد از کشت اکسپلنت . (c) برون رشد بعد از خارج کردن اکسپلنت حدود ۷ روز بعد از کشت اکسپلنت. عدسی شیئی × ۱۰.

بیشتر) اجزای شکننده تر بافت ممکن است تخریب شوند. بعنوان مثال در تومورهای رشته ای، بدست آمدن تفکیک کامل با تریپسین در حالی که هنوز سلول های کارسینوما زنده باقی بمانند، بسیار مشکل است.

انتخاب گرید تریپسین مصرفی مشکل می باشد چرا که دو روند متضاد وجود دارد :

۱)هرچقدر تریپسین خالص تر شود سمیت آن کاهش یافته و فعالیت آن بیشتر قابل پیش بینی می شود.

۲)هر چقدر تریپسین خام تر باشد ممکن است به خاطر وجود پروتئاز های دیگر مؤثرتر باشد.

در عمل ممکن است برای تعیین گرید بهینه برای محصول سلولی زنده به یک آزمایش مقدماتی نیاز باشد چرا که ممکن است پیش بینی تعادل بین حساسیت به اثرات سمی و توانایی تفکیک مشکل باشد. تریپسین خام متداول ترین آنزیم مورد استفاده در تفکیک بافت است زیرا به خوبی توسط بسیاری از سلول ها تحمل شده، برای بسیاری از بافت ها مؤثر بوده و

هرگونه فعالیت باقیمانده بعد از شستشو توسط سرم محیط کشت یا زمانی که محیط کشت فاقد سرم استفاده شود توسط یک بازدارنده تریپسین (مثلاً بازدارنده تریپسین سویا) خنثی می شود.

تریپسین گرم

برای حفظ حداکثر زیستایی لازم است که تماس سلول ها را با تریپسین فعال به حداقل رساند. بنابراین وقتی بافت کامل در دمای $37\ ^{\circ}C$ تریپسینه می شود، باید هر نیم ساعت یک بار سلول های جداشده جمع آوری شده و باید تریپسین با سانتریفوژ کردن و خنثی سازی با سرم محیط کشت برطرف شود.

دستور کار۵-۹ - تفکیک بافت در تریپسین گرم

طرح کلی

بافت خرد شده و به مدت چند ساعت در تریپسین همزنی می شود. هر نیم ساعت یک بار سلول های جداسازی شده جمع آوری و سانتریفوژ شده و در محیط کشت حاوی سرم ریخته می شود.

مواد

استریل:

بافت، ۵-۱ گرم

۵۰ mL DBSS

تریپسین (خام) ٪ ۲/۵ در D-PBSA یا نرمال سالین

۲۰۰ mL D-PBSA

محیط کشت حاوی سرم (مثل DMEM / F12 با ٪۱۰ FBS)

فلاسک های کشت، ۱۰-۵ عدد به ازای هر گرم بافت(به سلولاریتی بافت بستگی دارد)

پتری دیش های ۹cm که مخصوص کشت بافت نمی باشند

ویالهای وزن شده، لوله های سانتریفوژ ۵۰mL یا ظروف یونیورسال

فلاسک تریپسینه کردن: فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ mL یا فلاسک همزن دار

دانه های مغناطیسی، اتوکلاو شده در لوله آزمایش

پنس های خمیده

پی پت(پاستور ۲ mL و ۱۰ mL)

غیر استریل:

همزن مغناطیسی

هموسیتومتر یا دستگاه شمارشگر سلولی

دستور کار

۱-بافت را به DBSS استریل و تازه در پتری دیش ۹ cm انتقال داده و شستشو دهید.

۲-بافت را به یک دیش دیگر منتقل کرده و بافت های ناخواسته از قبیل چربی یا مواد مرده را جدا کنید و سپس به دیش سوم منتقل کنید.

۳-بافت را با اسکالپل های صلیبی به قطعات حدود ۳ mm خرد کنید.

۴-بافت را با پنس های خمیده به یک لوله یا ویال از قبل توزین شده انتقال دهید.

۵-اجازه دهید که قطعات ته نشین شوند.

۶-بافت را با تعلیق مجدد تکه ها در DBSS شستشو داده، اجازه دهید تکه ها ته نشین شوند و مایع سوپرناتانت را خارج کنید. این مرحله را دو بار دیگر تکرار کنید.

۷-ویال یا لوله را خشک کرده و مجدداً آن را وزن کنید.

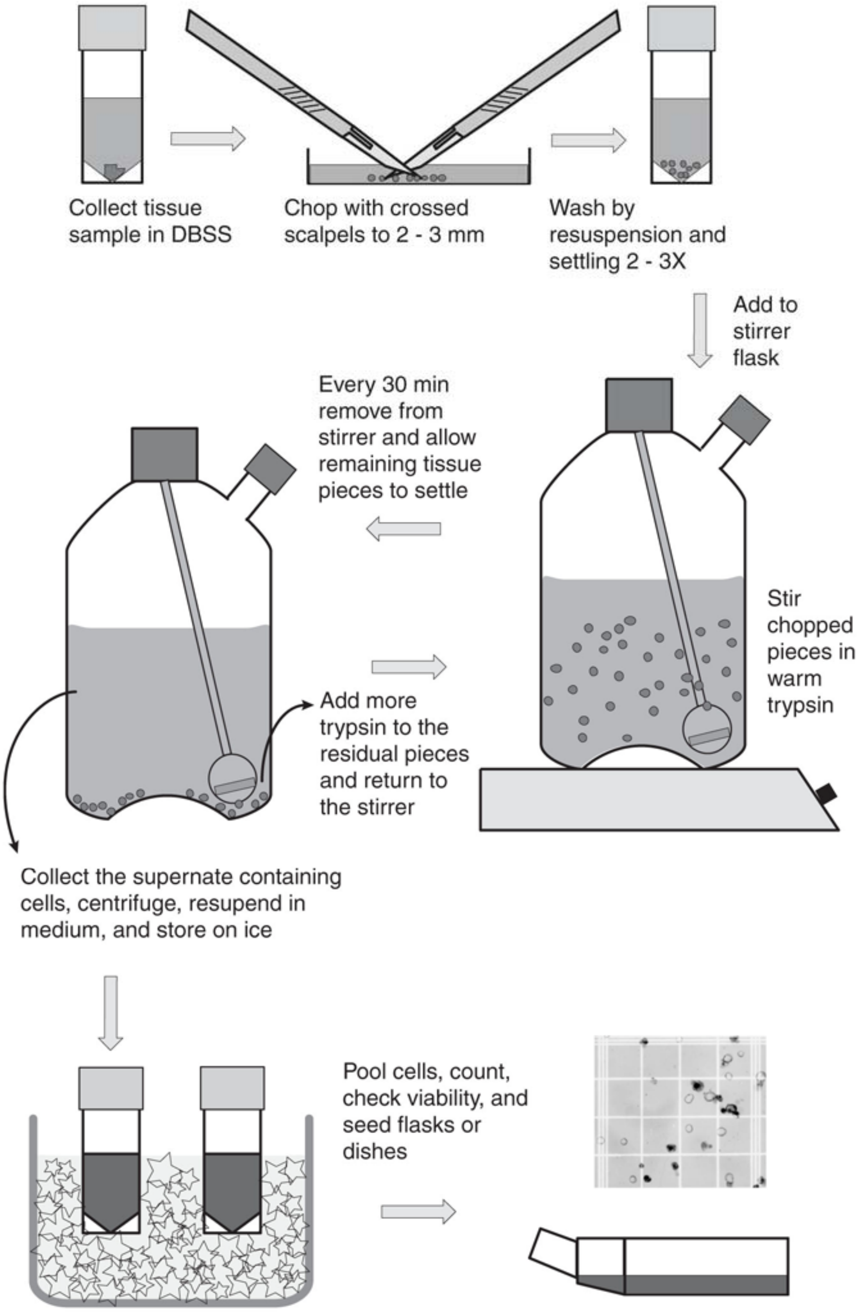
۸-قطعات را به فلاسک تریپسینیزاسیون خالی منتقل کنید و ویال یا لوله را با DBSS شستشو دهید.

۹-بیشتر مایع باقی مانده را خارج کرده و ۱۸۰ mL از D-PBSA به آن اضافه کنید.

۱۰- ۲۰mL تریپسین ٪۲/۵ به آن اضافه کنید(در این مرحله می توان در صورت نیاز آنزیم های دیگر مثل کلاژناز، هیالورونیداز یا DNase را نیز اضافه کرد).

۱۱-یک دانه مغناطیسی به فلاسک اضافه کنید.

۱۲-در فلاسک را بسته و آن را بر روی یک همزن مغناطیسی در یک انکوباتور یا گرمخانه در دمای$37\ ^{\circ}C$ قرار دهید.



شکل ۷-۹: تفکیک با روش تریپسین گرم.

۱۳-به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در حدود ۱۰۰ rpm همزنی کنید.

۱۴-بعد از ۳۰ دقیقه سلول های جداسازی شده را مطابق روش زیر جمع آوری کنید:

a) اجازه دهید که تکه ها ته نشین شوند.

b) سوپرناتانت را به داخل یک لوله سانتریفوژ ریخته و آن را بر روی یخ قرار دهید.

c) تریپسین تازه را به تکه های باقی مانده در فلاسک اضافه کرده و به همزدن آن ادامه دهید و به مدت ۳۰ دقیقه دیگر آن را انکوبه کنید.

d)سلول های جمع آوری شده مرحله (b) را به مدت ۵ دقیقه در g ۵۰۰ سانتریفوژ کنید.

e)مجدداً رسوب بدست آمده را در mL ۱۰ محیط کشت حاوی سرم به حالت تعلیق در آورید و سوسپانسیون را روی یخ نگهداری کنید.

۱۵–مرحله ۱۴ را تا زمانی که تفکیک کامل انجام شود یا تا زمانی که دیگر تفکیک آشکاری صورت نگیرد(معمولاً ۴–۳ ساعت) تکرار کنید.

۱۶–سوسپانسیون سلولی سرد شده را جمع آوری و مخلوط کرده، سلول ها را با هموسیتومتر یا دستگاه سلول شمار الکترونیکی شمرده و زیستایی را بررسی کنید.

۱۷–چون جمعیت سلولی خیلی ناهمگون خواهد بود، دستگاه سلول شمار الکترونیکی در ابتدا به تطبیق با یک هموسیتومتر نیاز دارد، زیرا ممکن است کالیبراسیون مشکل باشد.

۱۸–تکه های بزرگ باقیمانده را با صاف کردن توسط muslin یا الک اختصاصی استریل خارج کنید.

۱۹–سوسپانسیون سلولی را در محیط کشت تا $۱۰^6 \times ۱$ سلول در هر میلی لیتر رقیق کرده و با حدود $۱۰^5 \times ۲$ سلول در هر سانتیمتر مربع در تعداد کافی فلاسک بذرافشانی کنید. وقتی که میزان بقاء نامشخص یا غیر قابل پیش بینی می باشد، شمارش سلولی از ارزش کمی برخوردار است(مثلاً در بیوپسی های تومور، که در آن ممکن است نسبت سلول های مرده کاملاً بالا باشد). در این مورد، محدوده ای از غلظت ها از حدود ۵ تا mg ۲۵ بافت در هر میلی لیتر را تهیه کنید.

۲۰–محیط کشت را در فواصل زمانی منظم تعویض کنید(۴–۲ روز با توجه به کاهش pH). سوپرناتانت را قبل از این که دور بریزید از نظر سلول های زنده بررسی کنید زیرا بعضی از سلول ها آهسته چسبیده یا حتی ممکن است ترجیح دهند در حالت شناور تکثیر یابند.

این تکنیک برای تفکیک مقادیر زیادی از بافت در زمان نسبتاً کوتاه، به خصوص برای جنین های موشی یا جنین های جوجه کامل مفید می باشد. این تکنیک در مورد بافت بالغ به خوبی کار نمی کند زیرا در آن مقدار زیادی از بافت همبند رشته ای وجود دارد و همزدن مکانیکی می تواند به بعضی از انواع سلولی حساستر از قبیل اپی تلیوم آسیب برساند. در صورتی که بعد از سانتریفوژ کردن و تعلیق مجدد، تجمع مجدد سلول ها صورت پذیرفت، آن را به مدت ۲۰–۱۰ دقیقه در µg/mL ۲۰–۱۰ از DNase انکوبه کرده و مجدداً سانتریفوژ کنید.

جدول ۱–۹: راندمان سلولی در روش تریپسینه کردن سرد و گرم

Duration and temperature of trypsinization		After trypsinization: Cells recovered per embryo $\times 10^{-7}$	After trypsinization: % Viability by dye exclusion (Trypan blue)	After trypsinization: Total no. of viable cells $\times 10^{-7}$	After 24 h in culture: Recovered, % of total seeded	After 24 h in culture: Viability, % of viable cells seeded
4°C	37°C					
0 h	4 h	1.69	86	1.45	47.2	54.9
5.5 h	0.5 h	3.32	60	1.99	74.5	124
24 h	0.5 h	3.40	75	2.55	60.3	80.2

تریپسینه کردن با پیش تیمار سرد

یکی از معایب استفاده از تریپسین برای تفکیک بافت، آسیبی می باشد که ممکن است به دلیل تماس طولانی مدت بافت با تریپسین در دمای 37 °C ایجاد شود، بنابراین نیاز به جمع آوری سلول ها بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در روش تریپسین گرم بهتر از آن است که آنها را برای کل زمان (یعنی ۳ تا ۴ ساعت) که برای تفکیک کل بافت مورد نیاز است در معرض تریپسین قرار دهیم. یک روش ساده برای به حداقل رساندن آسیب به سلول ها در طی تفکیک این است که بافت را در دمای 4 °C در تریپسین قرا داده تا باعث نفوذ آنزیم با فعالیت تریپتیک کم شود. بعد از این فرایند بافت برای تفکیک به انکوباسیون خیلی کوتاهتری در دمای 37 °C نیاز دارد.

دستور کار ۶-۹- تفکیک بافت در تریپسین سرد

طرح کلی

بافت را خرد کرده و آن را به مدت ۱۸-۶ ساعت در دمای 4 °C در تریپسین قرار دهید. بعد از خارج کردن تریپسین بافت را انکوبه کرده و سلول ها را در محیط کشت گرم پراکنده کنید.

مواد

استریل یا تهیه شده در شرایط سترون:

۵-۱ گرم بافت که قبلاً وزن شده است

محیط کشت رشد(مثلاً DMEM/F12 با ۱۰٪ FBS)

DBSS

تریپسین خام ۰/۲۵٪ در RPMI 1640 فاقد سرم یا نمک های MEM/Stirrer(S-MEM)

پتری دیش های 9 cm که مخصوص کشت بافت نمی باشد

پنس های مستقیم و خمیده

اسکالپل

فلاسک ارلن مایر ۲۵ یا 50 mL درپیچ دار که قبلاً وزن شده است(یا ویال شیشه ای یا ظرف یونیورسال)

فلاسک های کشت ۲۵ cm^2 یا ۷۵ cm^2

پی پت(پاستور 2 mL و 10mL)

غیر استریل:

وان یخ (ice bath)

دستور کار

۱-بافت را به DBSS تازه و استریل در یک پتری دیش 9cm منتقل کرده و شستشو دهید.

۲- بافت را به یک دیش دیگر انتقال داده، بافت های ناخواسته از قبیل چربی یا مواد مرده را جدا کنید.

۳-بافت را به دیش سوم انتقال داده و با اسکالپل های صلیبی بافت را به قطعات حدود 3 mm خرد کنید. اگر اندام های جنینی از این اندازه بزرگتر نباشند، بهتر است به صورت دست نخورده باقی بمانند.

۴-بافت را با پنس های خمیده به یک ویال استریل ۱۵ یا 50 mL استریل از قبل وزن شده انتقال دهید.

۵-اجازه دهید که تکه ها ته نشین شوند.

۶-با تعلیق مجدد قطعات در BSS بافت را شستشو داده، اجازه دهید تکه ها ته نشین شوند و مایع سوپرناتانت را خارج کنید. این مرحله را دو بار دیگر تکرار کنید.

۷-بیشتر مایع باقی مانده را با دقت خارج کرده و مجدداً ویال را وزن کنید.

۸- در هر لوله به ازای هر گرم بافت 10mL تریپسین ۰/۲۵٪ در RPMI 1640 یا S-MEM در دمای 4 °C اضافه کنید.

۹-مخلوط را به مدت ۱۸-۶ ساعت در دمای 4 °C قرار دهید.

۱۰-تریپسین را با دقت خارج کرده و دور بریزید (ممکن است در این مرحله در صورت نیاز 1-2 mL از آنزیم های دیگر مثل کلاژناز، هیالورونیداز یا DNase اضافه شود).

۱۱-لوله را به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای 37 °C قرار دهید.

۱۲-تقریباً 1 mL محیط کشت گرم به ازای هر 100 mg بافت اولیه اضافه کرده و به آرامی مخلوط را به سمت بالا و پایین پی پت کرده تا بافت کاملاً پخش شود.

۱۳-اگر بعضی از بافت ها پراکنده نشدند، ممکن است سوسپانسیون سلولی با muslin یا توری فولادی زد زنگ

شکل ۸-۹: صافی سلولی. لوله و فیلتر پلی پروپیلن یکبار مصرف برای صاف کردن توده ها از سوسپانسیون اولیه. همچنین از آن می توان برای تفکیک بافت های نرم استفاده کرد.

استریل (۲۰۰-۱۰۰ µm) یا یک صافی پلاستیکی یکبار مصرف فیلتر شده یا اجازه داده شود که تکه های بزرگتر ته نشین شوند. وقتی که مقدار زیادی بافت وجود دارد، افزایش دادن حجم محیط کشت مورد استفاده برای تعلیق تا ۲۰ mL برای هر گرم از بافت، ته نشینی و جمع آوری بعدی مایع سوپرناتانت را آسانتر می کند .

۱۴-غلظت سلولی را در سوسپانسیون با هموسیتومتر یا سلول شمار الکترونیکی تعیین کرده و میزان زیستایی را بررسی کنید.

۱۵-جمعیت سلولی خیلی ناهمگون خواهد بود ؛ شمارش الکترونیکی سلول ها در ابتدا به تطبیق با یک هموسیتومتر نیاز دارد زیرا ممکن است کالیبراسیون آن مشکل باشد .

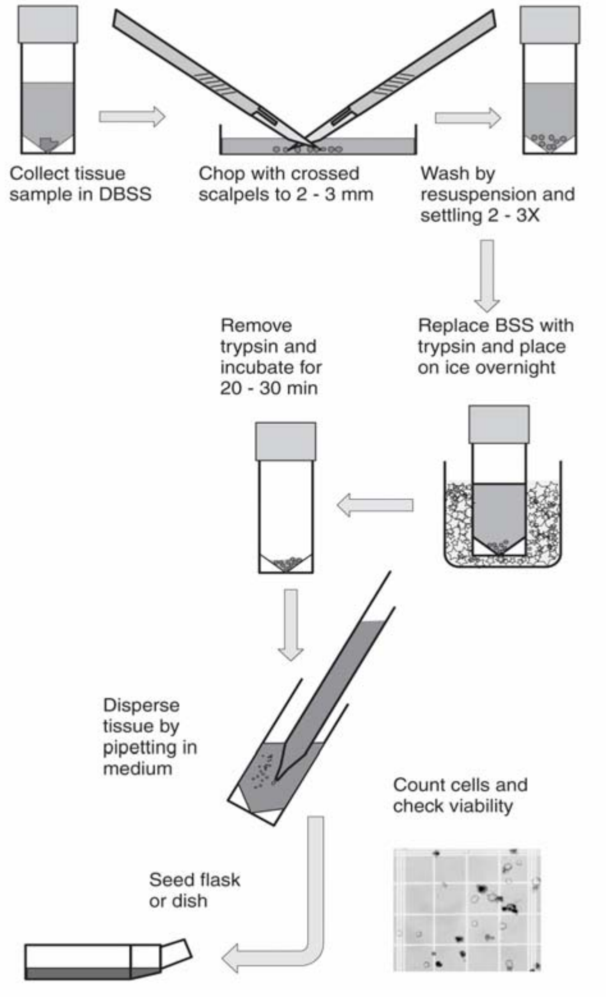
۱۶-سوسپانسیون سلولی را در محیط کشت تا ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر رقیق کرده و با حدود ۲×۱۰^{5} سلول در سانتیمتر مربع در تعداد کافی فلاسک بذر افشانی کنید. وقتی که میزان بقاء نامشخص بوده یا غیر قابل پیش بینی می باشد، شمارش سلولی از ارزش کمی برخوردار است(مثلاً در بیوپسی های تومور که در آنها نسبت سلول های مرده ممکن است کاملاً بالا باشد) در این مورد محدوده ای از غلظت ها از حدود ۵ تا ۲۵ mg بافت در هر میلی لیتر تهیه کنید.

۱۷-محیط کشت را در فواصل زمانی منظم تعویض کنید(۴-۲ روز با توجه کاهش pH). سوپرناتانت را قبل از این که دور بریزید از نظر سلول های زنده بررسی کنید زیرا بعضی از سلول ها آهسته چسبیده یا حتی ممکن است ترجیح دهند در حالت شناور تکثیر یابند.

روش تریپسین سرد معمولاً راندمان بالاتری از سلول های زنده با بقاء بیشتر بعد از ۲۴ ساعت کشت می دهد و نسبت به روش گرم، انواع سلول های متنوع تری را حفظ می کند. کشت های جنین موش وقتی که با روش سرد تهیه می شوند حاوی سلول های اپی تلیال بیشتری می باشند و کشت های اریتروئید از کبد جنین ۱۳ روزه موش بعد از این تیمار به اریتروپوئیتین پاسخ می دهد اما بعد از روش تریپسین گرم یا تفکیک مکانیکی به اریتروپوئیتین پاسخ نمی دهند. همچنین روش تریپسین سرد مناسب است چون هیچگونه همزنی یا سانتریفوژی مورد نیاز نمی باشد و ممکن است به مدت یک شب انکوباسیون در دمای ۴°C انجام شود.

روش های آنزیمی دیگر

تفکیک بافت ها با تریپسین ممکن است باعث ایجاد صدمه شود(مثلاً به بعضی از سلول های اپی تلیال) یا ممکن است غیر مؤثر باشد(مثلاً برای بسیاری از بافت های رشته ای از قبیل بافت همبند رشته ای) بنابراین تلاش برای استفاده از آنزیم های دیگر در حال انجام می باشد. چون ماتریکس خارج سلولی مخصوصاً در بافت همبند و عضلانی اغلب دارای کلاژن می باشد، کلاژناز انتخاب مناسبی می باشد. همچنین پروتئازهای باکتریایی دیگر از قبیل پروناز و دیسپاز با درجه های مختلف از موفقیت استفاده شده اند. شرکت کربوهیدرات ها در اتصال بین سلولی منجر به استفاده از هیالورونیداز و نورآمینیداز به همراه کلاژناز شده است.



شکل ۹-۹: تفکیک با روش تریپسین سرد.

کلاژناز

این تکنیک برای بسیاری از بافت های: جنینی، بالغ، طبیعی و بدخیم بسیار ساده و مؤثر می باشد. وقتی که بافت حاوی فیبر فراوان بوده یا نسبت به تریپسین حساس می باشد، این تکنیک بیشترین استفاده را دارد. اغلب کلاژناز به صورت خام استفاده شده و ممکن است بعضی از فعالیت های آن به دلیل آلودگی با پروتئاز های غیر اختصاصی دیگر باشد. در صورتی که فعالیت پروتئولیتیک غیر اختصاصی آن نامطلوب باشد، گریدهای خیلی خالص تر از آن موجود می باشد، اما ممکن است تأثیر این گریدها به اندازه کلاژناز خام نباشد.

دستور کار ۷-۹- تفکیک بافت در کلاژناز

طرح کلی

بافت خرد شده را در محیط کشت کامل حاوی کلاژناز قرار داده و انکوبه کنید . وقتی بافت تفکیک شد، کلاژناز را با سانتریفوژ کردن خارج کرده و سلول ها را با یک غلظت بالا بذرافشانی و کشت دهید.

مواد

استریل:

کلاژناز(۲۰۰۰U/mL)، Worthington CLS یا Sigma 1A

محیط کشت، مثلاً DMEM/F12 با ۱۰٪ FBS

DBSS

پی پت های ۱mL و ۱۰mL

پتری دیش های ۹ cm که مخصوص کشت بافت نمی باشند

فلاسک های کشت ۲۵ cm^2

لوله های سانتریفوژ ۱۵-۵۰ mL، بر حسب مقدار بافتی که قرار است عمل آوری شود.

اسکالپل

غیر استریل:

سانتریفوژ

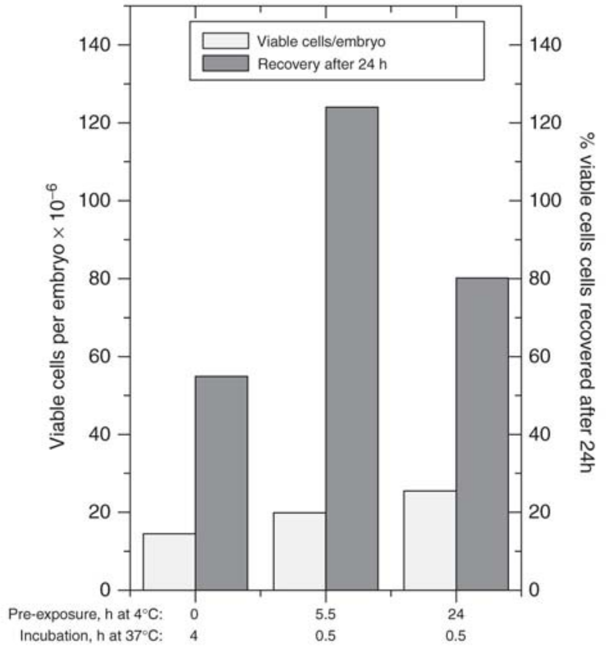
دستور کار

۱-بافت را به DBSS تازه و استریل منتقل کرده و شستشو دهید.

۲-بافت را به یک دیش دیگر انتقال داده، بافت های ناخواسته از قبیل چربی یا مواد مرده را جدا کنید.

۳-بافت را به یک دیش سوم انتقال داده و با دقت آن را توسط اسکالپل های صلیبی به قطعات ۱ mm خرد کنید.

۴-بافت را با پی پت(۱۰-۲۰ mL دهان گشاد) به یک ظرف یونیورسال یا لوله سانتریفوژ استریل ۱۵ یا ۵۰ mL انتقال



شکل۱۰-۹: تریپسینه کردن سرد و گرم. بازده سلولها زیستا به ازای هر جنین توسط روش های تریپسینه کردن سرد و گرم. بازده سلولهای زیستا به ازای هر جنین با روش تریپسینه کردن سرد در دمای $4^\circ C$ تا ۲۴ ساعت افزایش می یابد اما بازیافت پس از ۲۴ ساعت کشت با تریپسینه کردن کوتاهتر بیشترین مقدار می باشد(٪۱۰۰ <) شاید به دلیل این که تعدادی از سلولهایی که توسط تریپسینه کردن سرد طولانی تر آزاد می شوند، قابلیت تکثیر ندارند.

دهید(ابتدا داخل پی پت را با DBSS مرطوب کنید در غیر این صورت تکه ها به پی پت می چسبند).

۵-اجازه دهید که تکه ها ته نشین شوند.

۶-با تعلیق مجدد تکه ها در DBSS، بافت را شستشو دهید. اجازه دهید که تکه ها ته نشین شوند و مایع سوپرناتانت را خارج کنید. این مرحله را دو بار دیگر تکرار کنید.

۷-۳۰-۲۰ تکه را به یک فلاسک ۲۵ cm^2 و ۲۰۰-۱۰۰ تکه را به یک فلاسک دیگر انتقال دهید.

۸-DBSS را خارج کرده و ۴/۵ mL محیط کشت رشد حاوی سرم را به هر فلاسک اضافه کنید.

۹-۰/۵ mL کلاژناز خام ۲۰۰۰ U/mL اضافه کرده تا یک غلظت نهایی ۲۰۰ U/mL از کلاژناز بدست آید.

۱۰-به مدت ۴۸-۴ ساعت در دمای ۳۷ $^\circ C$ بدون همزنی انکوبه کنید. ممکن است اگر تفکیک آهسته باشد(مثلاً در کارسینوماهای سیروز سینه یا کولون)بافت توموری تا ۵ روز یا بیشتر در همان حالت باقی گذاشته شود. هرچند ممکن است لازم باشد قبل از این که این زمان تمام شود اگر کاهش زیادی در pH مشاهده شد (یعنی کمتر از pH ۶/۵) بافت را سانتریفوژ کرده و مجدداً در یک محیط کشت تازه و کلاژناز به حالت تعلیق درآورد.

۱۱-با تکان دادن ملایم فلاسک، از نظر تفکیک مؤثر آنرا بررسی کنید؛ تکه های بافت در ته فلاسک با همزنی ملایم به سلول های منفرد و دسته های کوچک تفکیک می شوند.

۱۲-در مورد بعضی از بافت ها (مثل ریه، کلیه و کولون یا کارسینومای پستان)، دسته های کوچکی از سلول های اپی تلیال دیده می شوند که به کلاژناز مقاوم بوده و ممکن است که اجازه داده شود به مدت ۲ دقیقه ته نشین شده تا از بقیه سلول ها جدا شوند. اگر این دسته ها با تعلیق مجدد و ته نشین شدن در DBSS بیشتر شستشو شوند و رسوب ها در محیط کشت بذرافشانی شوند، توده های سالمی از سلول های اپی تلیال را تشکیل خواهند داد. معمولاً اگر سلول های اپی تلیال به طور کامل تفکیک نشوند بهتر زنده می مانند.

۱۳-وقتی که تفکیک کامل صورت پذیرفت یا وقتی بعد از این که دسته ها رسوب کردند، سلول های سوپرناتانت جمع آوری شدند، مخلوط را به مدت ۳ دقیقه در ۱۰۰-۵۰ g سانتریفوژ کنید.

۱۴-سوپرناتانت DBSS را دور ریخته، مجدداً رسوبات را در ۵ mL محیط کشت به حالت تعلیق درآورده، ترکیب کرده و در یک فلاسک ۲۵ cm^2 بذرافشانی کنید. اگر در طی تیمار کلاژناز، pH کاهش یابد(pH ۶/۵ یا کمتر در عرض ۴۸ ساعت) ، بعد از خارج کردن کلاژناز، سوپرناتانت را با محیط کشت دو تا سه برابر رقیق کنید.

۱۵-محیط کشت را بعد از ۴۸ ساعت جایگزین کنید.

بعضی سلول ها، مخصوصاً ماکروفاژها ممکن است در طی انکوباسیون کلاژناز به فلاسک اول بچسبند. انتقال سلول ها بعد از تیمار با کلاژناز (و سپس خارج کردن کلاژناز) به یک فلاسک تازه، بسیاری از ماکروفاژها را از کشت خارج می کند. ممکن است در صورت نیاز، فلاسک اول هم کشت داده شود. تریپسینه کردن اندک، هر نوع سلول چسبیده به غیر از ماکروفاژها را جدا خواهد کرد.

ثابت شده است که تفکیک در کلاژناز مخصوصاً برای کشت تومورهای انسانی، کلیه موش، مغز جنین و انسان بالغ، ریه و بسیاری از بافت های دیگر مخصوصاً اپی تلیوم مناسب می باشد. فرایند کند بوده و به هیچ گونه همزنی مکانیکی یا وسایل خاصی نیاز ندارد. هرچند در مورد بیش از ۱ g بافت، مرحله تشریح خسته کننده بوده و ممکن است به دلیل مقدار کلاژناز مورد نیاز گران باشد. همچنین این فرایند اغلب سلول های بافت همبند را آزاد می کند، بنابراین در مواردی که رشد بیش از حد فیبروبلاست مشکل ساز باشد ممکن است که لازم باشد با کشت انتخابی یا جداسازی سلولی دنبال شود.

دسته های مجزای سلول های اپی تلیال که با تفکیک در کلاژناز و با روش تریپسین سرد تولید شده اند را می توان زیر میکروسکوپ انتخاب کرد و به صورت تنها یا به همراه سلول های تغذیه کننده تیمار شده با میتوماسین– C یا پرتودهی شده به چاهک های اختصاصی در یک پلیت میکروتیتراسیون انتقال داد.

تفکیک مکانیکی

برون رشد سلول ها از اکسپلنت های اولیه یک فرآیند نسبتاً کند بوده و می تواند کاملاً انتخابی باشد. هضم آنزیمی که قبلاً در همین فصل شرح داده شد، نسبتاً پر زحمت بوده و گمان می رود کشتی را ایجاد کند که بیشتر نمایانگر بافت باشد. چون در طی هضم آنزیمی خطر آسیب رسیدن به سلول ها وجود دارد، بسیاری از افراد از روش های تفکیک مکانیکی مثل جمع آوری سلول هایی که هنگام برش دقیق بافت به بیرون ریخته می شوند، فشردن بافت انتخاب شده از طریق مجموعه ای از الک هایی که در آنها به تدریج قطر منافذ کاهش می یابد، یا عبور دادن بافت از یک سرنگ و سر سوزن یا پی پت کردن مکرر آن استفاده می کنند. این روش خیلی سریع تر از هضم آنزیمی، یک سوسپانسیون سلولی ایجاد می کند اما ممکن است باعث آسیب رساندن مکانیکی شود. این دستور کار یکی از روش های تفکیک مکانیکی می باشد که مشخص شده است در مورد بافت های نرم از قبیل مغز نسبتاً موفقیت آمیز بوده است.

دستور کار۸-۹- تفکیک مکانیکی با الک کردن

طرح کلی

بافتی که در محیط کشت قرار دارد با فشار از یک سری الک هایی که به تدریج در آنها قطر منافذ کاهش می یابد عبور داده شده تا یک سوسپانسیون مناسب از سلول های منفرد و توده های کوچک به دست آید. سپس سوسپانسیون رقیق شده و مستقیماً کشت داده می شود.

مواد

استریل:

محیط کشت مثلDMEM/F12 با ۱۰٪ FBS

پنس

الک های شماره دار از ۱۰۰ µm تا ۲۰ µm یا صافی سلولی فالکون

پتری دیش های ۹ cm

اسکالپل

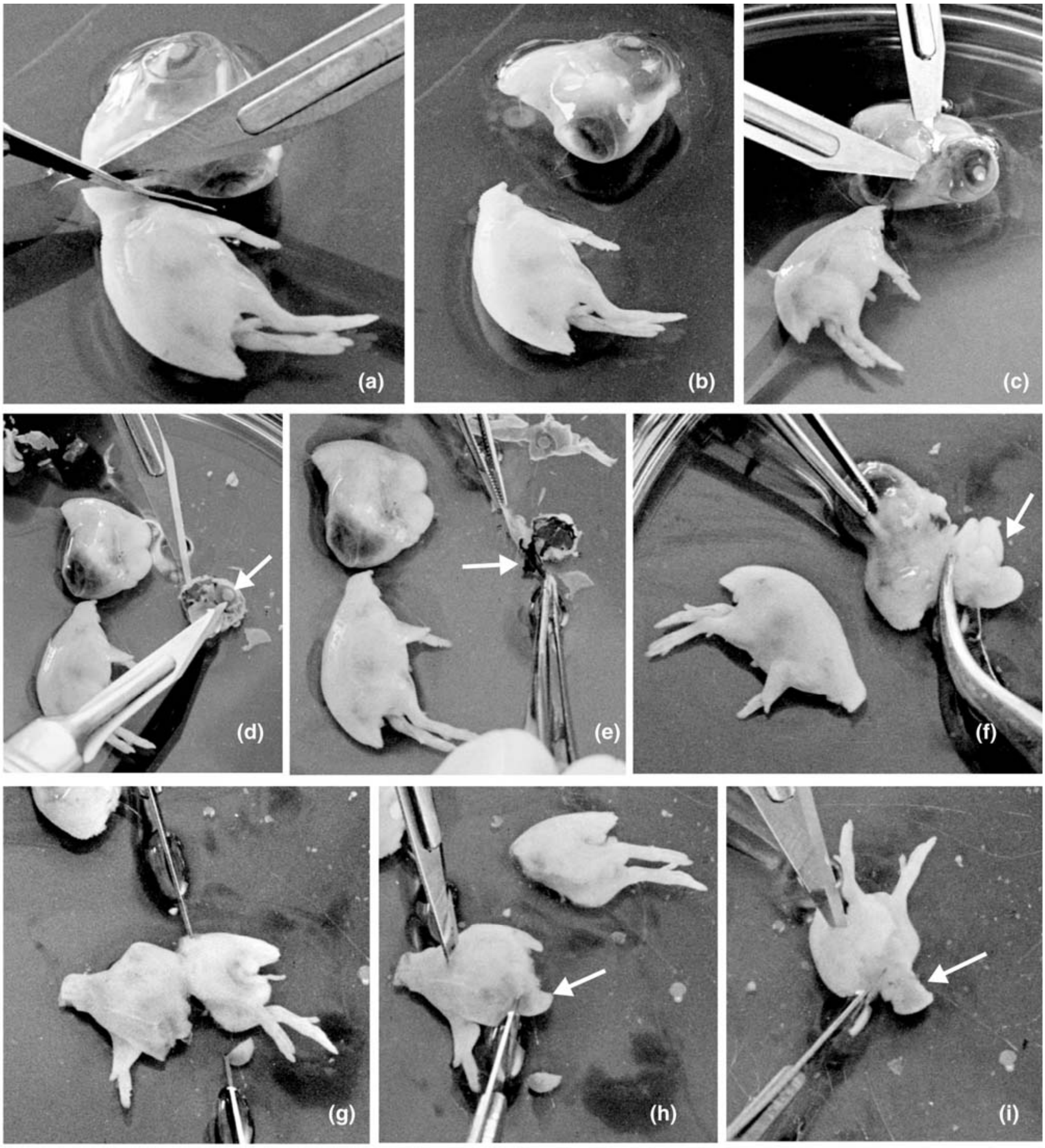
سرنگ پلاستیکی یکبار مصرف (۲ mL یا ۵ mL)

فلاسک های کشت

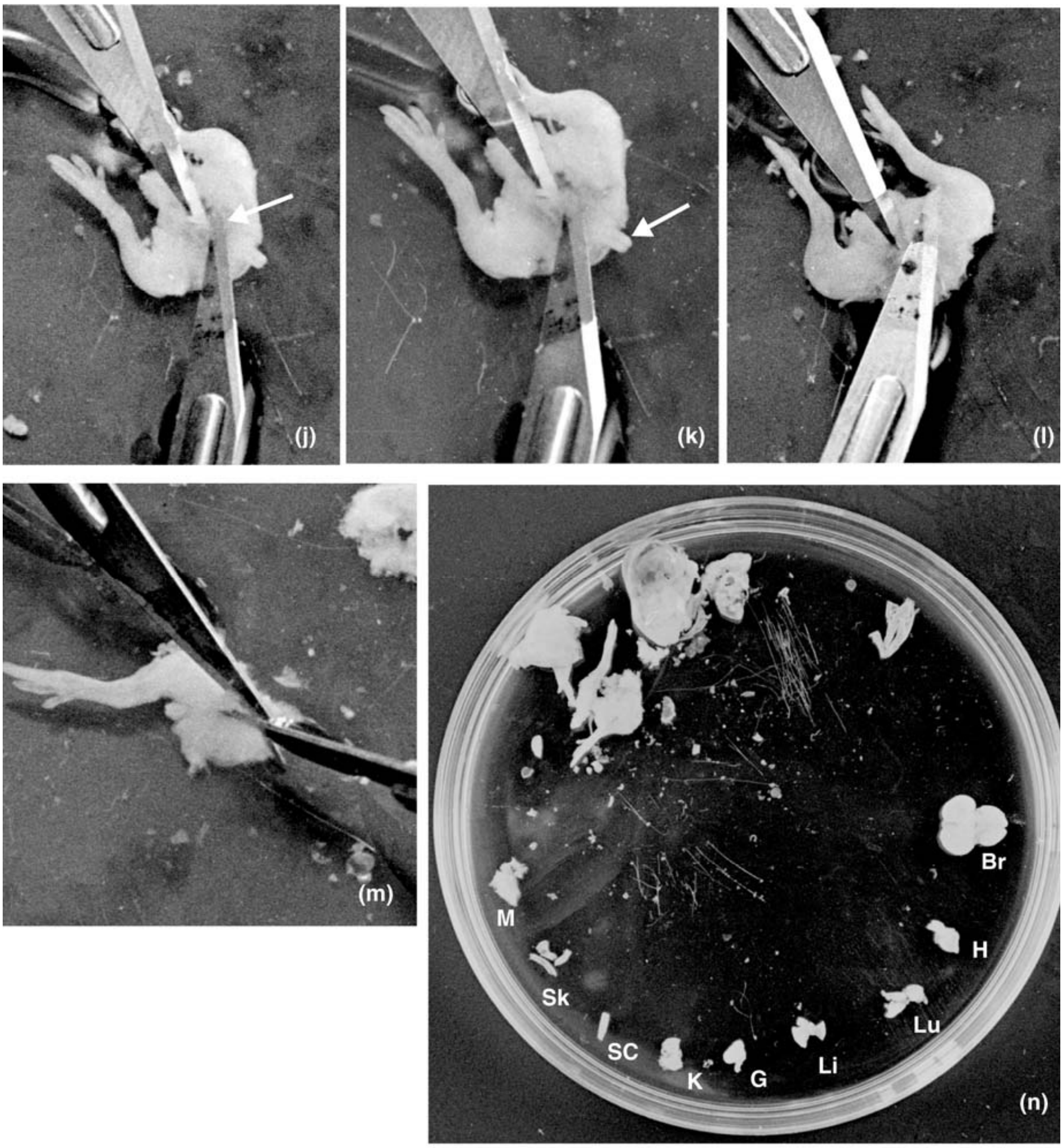
دستور کار:

۱-بعد از شستشو و تشریح مقدماتی بافت، آنرا را به تکه های حدود ۳-۵mm خرد کرده و چند تکه را در داخل یک الک از جنس استیل زد زنگ یا پلی پروپیلن که دارای منافذ با قطر ۱mm می باشند در یک پتری دیش ۹cm یا لوله سانتریفوژ قرار دهید.

۲-با استفاده از فشار ملایم توسط پیستون یک سرنگ پلاستیکی یک بار مصرف، بافت را از توری الک به داخل



شکل ۱۱-۹: تشریح یک جنین جوجه. (a) و(b) جدا کردن سر. (c) خارج کردن چشم. (d) تشریح عدسی ها. (e) جدا کردن شبکیه. (f) در آوردن مغز.(g) دو نیم کردن تنه.(h) خارج کردن قلب و ریه ها از نیمه جلویی. (i) خارج کردن ریه و روده ها از نیمه پشتی. (j) قرار دادن سراسکالپل بین کلیه چپ و دیواره بدنی پشتی. (k) خارج کردن طناب نخاعی. (l)کندن پوست عقب تنه و پای عقبی. (m) برش عضله ران. (n)اندام های اولیه که در اطراف دیش چیده شده اند. از سمت راست در جهت عقربه های ساعت اندام های زیر وجود دارند: مغز، قلب، ریه ها، کبد، سنگدان، کلیه ها، طناب نخاعی، پوست و عضله.

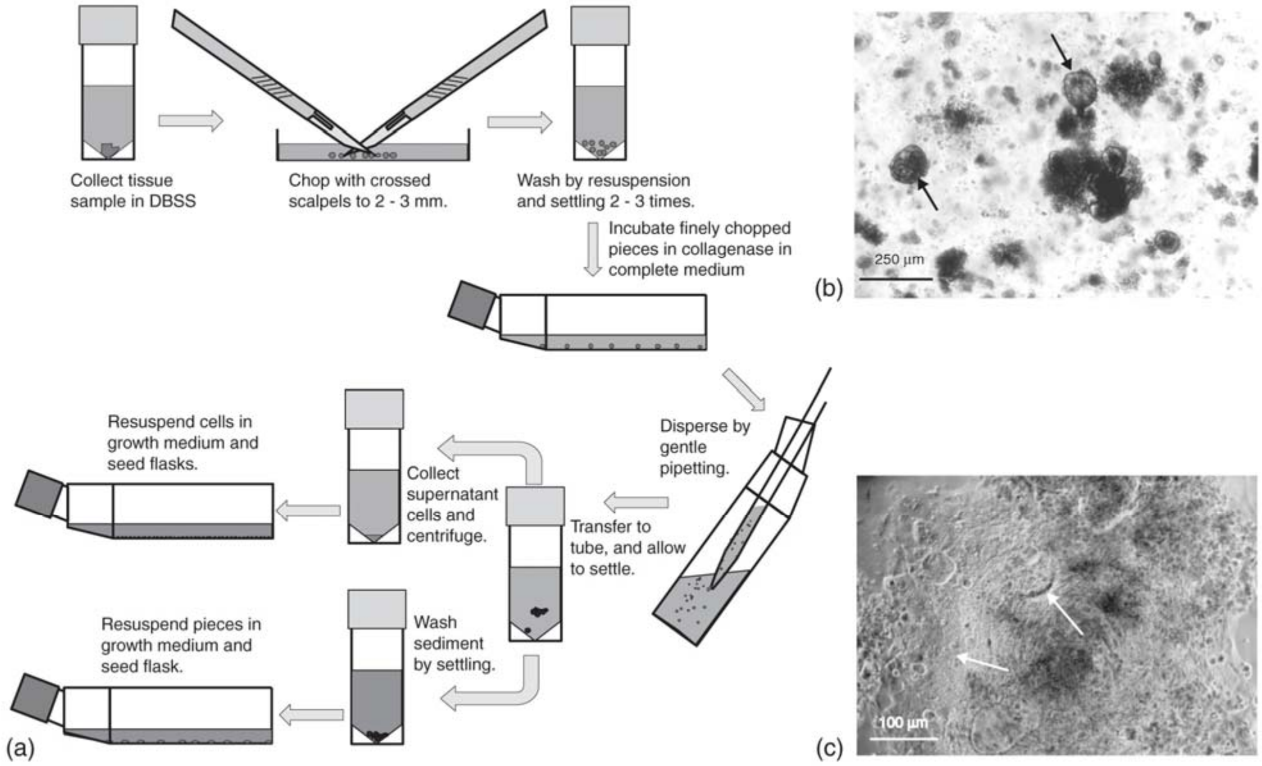


شکل ۱۱-۹:(ادامه)

محیط کشت برانید. محیط کشت بیشتری را از الک پی پت کرده تا سلول های موجود در آن شستشو شوند.

۳- بافتی را که نسبتاً تفکیک شده از پتری دیش به داخل یک الک که دارای منافذ ریزتری مثلاً منافذ ۱۰۰µm می باشد پی پت کرده و مرحله ۲ را تکرار کنید.

۴- ممکن است در این مرحله سوسپانسیون رقیق شده و کشت داده شود یا در صورتی که تولید یک سوسپانسیون تک سلولی مهم می باشد، ممکن است دوباره با الکی که دارای منافذ ۲۰µm می باشد غربال شود. به طور کلی هر چه قدر سوسپانسیون سلولی بیشتر پراکنده باشد فشار بیشتری مورد نیاز بوده و میزان زیستایی کاهش می یابد.



شکل ۱۲-۹: تفکیک بافت توسط کلاژناز. (a)شکل شماتیک تفکیک در کلاژناز. (b)گروه های سلولی از کارسینومای کولون انسان بعد از ۲۴ ساعت تفکیک در کلاژناز خام؛ قبل از خارج کردن کلاژناز. (c) همانند (b) اما بعد از خارج کردن کلاژناز، تفکیک بیشتر توسط پی پتینگ و کشت به مدت ۴۸ ساعت. دسته های کاملاً گرد شده در (پیکان های سیاه) در (b) صفحات شبیه اپی تلیوم (پیکان های سفید) در (c) را تشکیل می دهد.

۵- با رقیق کردن سوسپانسیون سلولی در محیط کشت، فلاسک های کشت را در غلظت های ۲×۱۰^{۵}، ۱×۱۰^{۶} و ۲×۱۰^{۶} سلول در میلی متر بذر افشانی کنید.

فقط بافت های نرم از قبیل طحال، کبد جنینی، مغز جنینی و بالغ و بعضی از تومور های نرم انسانی و حیوانی به این تکنیک به خوبی پاسخ می دهند. حتی در مورد مغز که به آسانی تفکیک نسبتاً کاملی به دست می آید، میزان زیستایی سوسپانسیون بدست آمده کمتر از هضم آنزیمی می باشد، هر چند زمان صرف شده ممکن است خیلی کمتر باشد. زمانی که میزان بافت موجود محدود نبوده و راندمان محصول مهم نباشد، در روش تفکیک مکانیکی ممکن است در مدت زمان کوتاهتری، تعداد زیادی از سلول های زنده به اندازه روش هضم آنزیمی اما با مصرف مقدار بسیار بیشتری از بافت تولید شود.

جداسازی سلول های زنده و غیر زنده

وقتی که یک کشت اولیه چسبنده از سلول های جدا سازی شده تهیه می شود، سلول های غیر زنده با اولین تعویض محیط کشت خارج می شوند. در مورد کشت های اولیه که به صورت سوسپانسیون نگهداری می شوند وقتی که تکثیر سلولی شروع می شود، به تدریج سلول های غیر زنده رقیق می شوند، هر چند در صورت نیاز می توان سلول های غیر زنده را با سانتریفوژ کردن سلول ها بر روی مخلوطی از فیکول (ficoll) و سدیم متریزوات (sodium metrizoate) (مثلاً

Hypaque یا Triosil) از سوسپانسیون اولیه خارج کرد. این تکنیک مشابه تهیه لنفوسیت ها از خون محیطی می باشد. سلول های زنده در حد فاصل بین محیط کشت و فیکول/ متریزوات جمع شده و سلول های مرده در ته لوله رسوب تشکیل می دهند.

دستور کار۹-۹- غنی سازی سلول های زنده

طرح کلی

تا $۲×۱۰^{۷}$ سلول در ۹mL محیط کشت بر روی ۶mL از ficoll-Hypaque در یک لوله سانتریفوژ در پیچ دار ۲۵mL ریخته می شود. سپس مخلوط سانتریفوژ شده و سلول های زنده از سطح مشترک جمع آوری می شوند.

مواد

استریل:

سوسپانسیون سلولی با حداقل توده های سلولی

لوله سانتریفوژ یا ظرف یونیورسال شفاف

D-PBSA

Ficoll Hypaque یا معادل آن (فیکول/ متریزوات به صورت ۱/۰۷۷ g/cc)

محیط کشت رشد

سرنگ با کانولای ضخیم یا سرسوزن مربعی (square-cut needle)، پی پت پاستور یا سمپلر

غیر استریل:

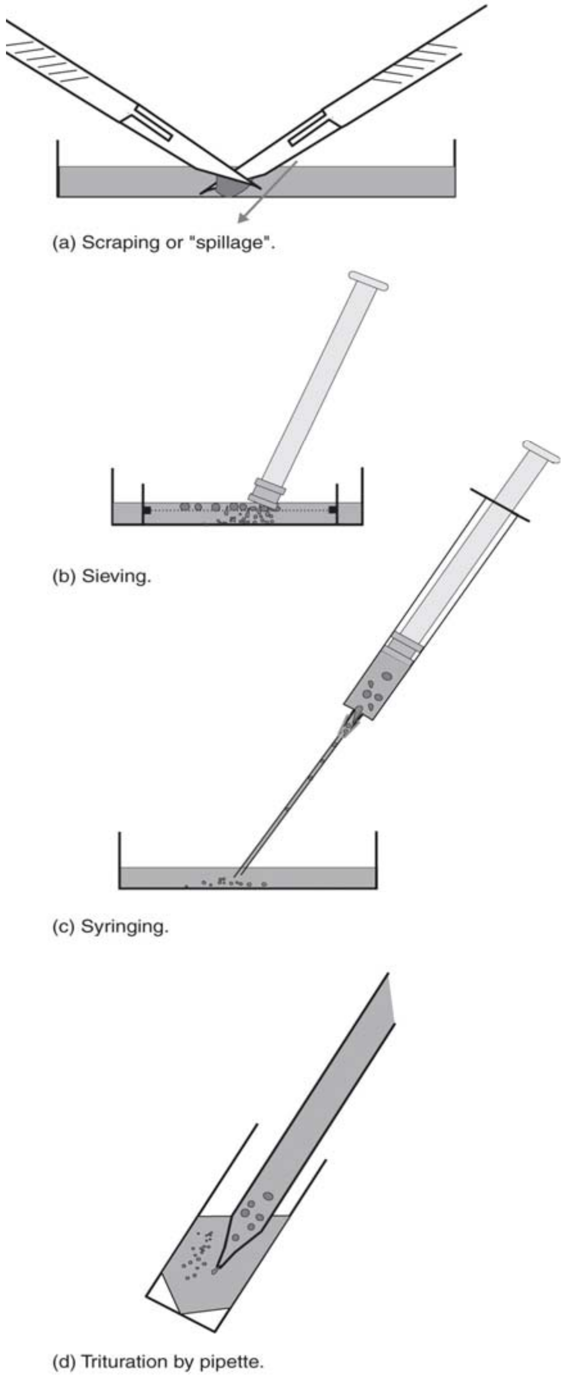
هموسیتومتر یا دستگاه شمارشگر سلولی

سانتریفوژ

دستور کار

۱- اجازه دهید که توده های بزرگ تر در سوسپانسیون سلولی ته نشین شوند.

۲- ۹mL سوسپانسیون سلولی را روی ۶mL مخلوط Ficoll-paque بریزید. این مرحله باید در یک لوله سانتریفوژ پهن و شفاف که دارای درپوش می باشد از قبیل



شکل ۱۳-۹: (a)تفکیک مکانیکی. تراشیدن یا "spillage". بریدن یا ساییدن سطح بریده شده و آزاد سازی سلولها. (b) غربال کردن. با استفاده از پیستون سرنگ، بافت با فشار از غربال عبور داده می شود. (c)سرنگ کردن. وارد کردن بافت به داخل سرنگ از طریق یک سر سوزن یا کانولای دهان گشاد و خارج کردن آن. (d)سایش توسط پی پت. پی پت کردن قطعات بافت به سمت بالا و پایین توسط پی پت دهان گشاد.

جدول ۲-۹: ثبت اطلاعات برای کشت اولیه

Date .... Time .... Operator ....

		Record
Origin of tissue	Species	
	Race or strain	
	Age	
	Sex	
	Path. no. or animal tag no.	
	Tissue	
	Site	
	Stored tissue/DNA location	
Pathology		
Disaggregation agent	Trypsin, collagenase, etc.	
	Concentration	
	Duration	
	Diluent	
Cell count	Concentration after resuspension (C_I)	
	Volume (V_I)	
	Yield ($Y = C_I \times V_I$)	
	Yield per g (wet weight of tissue)	
Seeding	Number (N) and type of vessel (flask, dish, or plate wells)	
	Final concentration (C_F)	
	Volume per flask, dish, or well (V_F)	
Medium	Type	
	Batch no.	
	Serum type and concentration	
	Batch no.	
	Other additives	
	CO_2 concentration	
Matrix coating	e.g., fibronectin, Matrigel, collagen	
Subculture	Recovery at 1st subculture, cell/flask	
	% (cells recovered ÷ cells seeded)	
	Cell line designation	

ظروف یونیورسال ۲۵mL، Nunclon یا Sterilin یـا در لولـه ۵۰mL پلاسـتیکی شـفاف Corning کـه دو برابـر حجم های ذکر شده در آن استفاده می شود صورت پذیرد.

۳- مخلوط را بـه مـدت ۱۵ دقیقـه در ۴۰۰g (در مرکـز سـطح مشترک اندازه گیری شود) سانتریفوژ کنید.

۴- با دقت لایه بالایی را بدون به هم زدن سطح مشترک خارج کنید.

۵- با استفاده از یک سرنگ، پی پت پاستور یـا سـمپلر سـطح مشترک را با دقت جمع آوری کنید.

نکته ایمنی) اگر شـما از مـواد انـسانی یـا نخستیان دیگـر استفاده می کنید از سوزن یا پی پت پاسـتور نـوک تیـز اسـتفاده نکنید.

۶-مخلوط را در محیط کـشت (مـثلاً DMEM/F12/10FB) تا ۲۰ mL رقیق کنید.

۷-مخلوط را به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰g سانتریفوژ کنید.

۸-مایع سوپرناتانت را دور ریخته و رسوب را مجدداً در ۵mL محیط کشت رشد به حالت تعلیق در آورید.

۹-مراحل ۷ و ۸ را تکرار کرده تـا سـلول هـا عـاری از محـیط کشت دانسیته شوند.

۱۰-تعداد سلول ها را با استفاده از هموسیتومتر یا یـک دسـتگاه شمارشگر الکترونیکی، شمارش کنید.

۱۱-فلاسک (های) کشت را بذر افشانی کنید.

این روش را می تـوان در مقیـاس هـای کوچـک تـر و یـا بزرگتر به کاربرد و با نسبت های پـایین تـری از محـیط کـشت دانسیته نسبت به سوسپانسیون سلولی (مثلاً ۵mL سوسپانسیون سلولی روی ۱mL محیط کشت) کار کرد.

خلاصه کشت اولیه

تفکیـک و آمـاده سـازی کـشت اولیـه، اولـین و شـاید حیاتی ترین مرحله در کـشت سـلول هـای بـا عملکـرد هـای اختصاصی می باشد. اگر سلول های مورد نیاز در این مرحلـه از دست بروند، این زیان غیر قابل برگشت مـی باشـد. بـسیاری از انواع سلول های مختلف ممکن است با انتخـاب تکنیـک هـای صحیح کشت داده شـوند. بـه طـور کلـی، اسـتفاده از تریپـسین نسبت به کلاژناز سخت تر بوده، اما گـاهی اوقـات بـرای تهیـه سوسپانسیون تک سلولی موثرتر می باشد. کلاژناز قـادر نیـست سلول های اپی تلیال را بـه آسـانی جـدا کنـد امـا ایـن ویژگـی می تواند برای جدا کردن سلول های اپی تلیـال از سـلول هـای استروما یک مزیت باشد. تفکیک مکـانیکی بـسیار سـریع تـر از روش استفاده از کلاژناز می باشد، اما به بـسیاری از سـلول هـا آسیب می رساند. بهتـرین روش ایـن اسـت کـه تکنیـک هـای مختلف تفکیک سلولی انجام شده و روشی که در سیـستم شـما بهتر کار می کند، انتخاب شود. اگر هیچ یـک از ایـن روش هـا موفقیت آمیز نبود، استفاده از آنزیم های دیگـر از قبیـل پرونـاز، دیسپاز و DNase را امتحان کرده و به مقالات دیگـر در مـورد کار با بافتی که مورد نظر شما است رجوع کنید.

گزارش های اولیه

بدون توجه به تکنیک مورد استفاده برای تولید یک کـشت، نگهداری گزارش های صحیح از منبـع و منـشاء کـشت، شـامل گونـه، جـنس و بـافتی کـه ازآن سرچـشمه گرفتـه، هـر گونـه آسیب شناسی مربوط و روش های مورد استفاده برای تفکیـک و کشت اولیه، مهم می باشد. اگر شما در شـرایط آزمایـشگاهی مناسـب (good laboratory practice: GLP) کـار می کنید، چنین یادداشت هایی نه تنها مطلـوب بلکـه اجبـاری می باشد. گزارش ها را می توان در دفتر کار و یـا بـه صـورت فایل کامپیوتری نگهداری کرد اما در این مرحلـه بهتـرین روش ثبت اطلاعات در یک پایگـاه داده کـامپیوتری مـی باشـد؛ ایـن یادداشت اولین مرحله در تعیین منـشاء رده سـلولی مـی باشـد. گزارش پایگاه داده ممکن است هرگـز فراتـر از مرحلـه کـشت اولیه پیش نرود اما از سوی دیگـر مـی توانـد اولـین مرحلـه در خلق یک گزارش صحیح از چیزی باشد که یک رده سـلولی بـا ارزش خواهد شد. اگر گزارش نامربوط شد می توان همیشه آن را حذف کرد، اما اگر رده سلولی اهمیت پیدا کرد نمی تـوان آن را بعداً ایجاد کرد.

چون ممکن است نیاز باشد، منبع یک رده سـلولی در یـک مرحله بعدی در تاریخچه زندگی آن تائید شـود، مخـصوصاً در صورتی که مشکوک به آلودگی متقاطع باشد، ذخیره یک نمونـه

از بافت، خون یا DNA از همان شخص در زمان جدا سازی بافت برای کشت اولیه مهم می باشد سپس این نمونه را می توان به عنوان مواد رفرانس برای انگشت نگاری DNA یا DNA profiling استفاده کرد.

فصل دهم

واکشت و رده‌های سلولی

واکشت و تکثیر

اولین واکشت مرحله انتقالی مهمی برای کشت می باشد. نیاز به واکشت دلالت بر این دارد که کشت اولیه گسترش یافته و تمام بستر موجود را اشغال کرده است. بنابراین تکثیر سلولی یک مشخصه مهم می باشد. هر چند ممکن است کشت اولیه بر حسب نوع سلولهای موجود در کشت نسبت رشد متفاوتی داشته باشد، بعد از اولین واکشت نسبت رشد معمولاً بالاست(٪۸۰ یا بیشتر). از یک کشت اولیه بسیار ناهمگن حاوی انواع سلولهای متفاوت موجود در بافت اصلی، یک رده سلولی همگن تر پدید می آید. علاوه بر اهمیت بیولوژیکی، این فرایند اهمیت کاربردی قابل توجهی دارد، چون کشت را می توان تکثیر کرد، تعیین هویت نمود و یا ذخیره کرد. این افزایش در تعداد سلولها و همگنی آنها، فرصت خوبی را برای انجام آزمایشات متعدد فراهم می کند.

اصطلاحات

به محض اینکه یک کشت اولیه واکشت داده شد (یا پاساژ داده شد)، آن کشت بعنوان یک رده سلولی شناخته می‌شود. این واژه دلالت بر حضور چندین دودمان سلولی با فنوتیپ‌های مشابه یا متفاوت دارد. اگر یک دودمان سلولی توسط کلونینگ، جداسازی فیزیکی سلولی، یا هر تکنیک انتخابی دیگر انتخاب شود تا ویژگیهای اختصاصی معینی را که در قسمت عمده سلولها در کشت شناسایی شده را داشته باشد، این رده سلولی بعنوان یک سویه سلولی (cell strain) شناخته می‌شود. بعضی از رده‌های سلولی و سویه‌های سلولی که به طور متداول استفاده می‌شوند در جدول۱-۱۰ ذکر شده است. اگر یک رده سلولی در *in vitro* ترانسفورمه شود به رده سلولی پیوسته تبدیل می‌شود و اگر انتخاب یا کلون و تعیین هویت شود، بعنوان سویه سلولی پیوسته شناخته می‌شود. در این مرحله تعیین هویت رده سلولی و اطمینان از عدم آلودگی با سایر رده ها ضروری است. بسیاری از رده های سلولی با سلولهای HeLa یا سایر رده های سلولی تند رشد آلوده می باشند(جدول ۲-۱۰). مزایا و معایب نسبی رده‌های سلولی متناهی (finite cell lines) و رده‌های سلولی پیوسته در جدول۳-۱۰ آورده شده است.

اولین واکشت باعث ایجاد کشت دوم، دومین واکشت باعث تبدیل کشت دوم به کشت سوم و به همین ترتیب می‌شود، هر چند در عمل بعد از کشت سوم این نامگذاری به ندرت استفاده می‌شود. در کار Hay flick و همکارانش با فیبروبلاست‌های دیپلوئید انسانی، در هر واکشت، کشت به نصف تقسیم می‌شد (یعنی نسبت تقسیم ۱:۲ بود)، بنابراین شماره پاساژ (passage number) با شماره نسل(generation number) یکسان بود. شماره پاساژ تعداد دفعاتی است که کشت واکشت داده می‌شود، در حالیکه شماره نسل تعداد دو برابر شدن‌هایی است که جمعیت طی کرده است. وقتی که نسبت تقسیم ۱:۲ می‌باشد همانند آزمایشات Hay flick، شماره پاساژ تقریباً با شماره نسل مساوی می‌باشد. هر چند اگر واکشت در نسبت‌های تقسیم بالاتر از ۱:۲ انجام شود، شماره نسل که شاخص خوبی از سن کشت می‌باشد، سریعتر از شماره پاساژ افزایش خواهد یافت. هیچ یک از این روشها تعداد سلولهایی که از طریق نکروز، آپوپتوزیس، تمایز یا پیری زودرس و کناره گیری از چرخه که احتمالاً در همه چرخه‌های رشد بین هر واکشت اتفاق می‌افتد را شامل نمی‌شود.

جدول ۱-۱۰: رده های سلولی پرمصرف

Cell line	Morphology	Origin	Species	Age	Ploidy	Characteristics	Reference
Finite, from Normal Tissue							
IMR-90	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Nichols et al., 1977
MRC-5	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Jacobs, 1970
MRC-9	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection; contact inhibited	Jacobs, et al., 1979
WI-38	Fibroblast	Lung	Human	Embryonic	Diploid	Susceptible to human viral infection	Hayflick & Moorhead, 1961
Continuous, from Normal Tissue							
293	Epithelial	Kidney	Human	Embryonic	Aneuploid	Readily transfected.	Graham et al., 1977
3T3-A31	Fibroblast		Mouse BALB/c	Embryonic	Aneuploid	Contact inhibited; readily transformed	Aaronson & Todaro, 1968
3T3-L1	Fibroblast		Mouse Swiss	Embryonic	Aneuploid	Adipose differentiation	Green & Kehinde, 1974
BEAS-2B	Epithelial	Lung	Human	Adult			Reddel et al., 1988
BHK21-C13	Fibroblast	Kidney	Syrian hamster	Newborn	Aneuploid	Transformable by polyoma	Macpherson & Stoker, 1962
BRL 3A	Epithelial	Liver	Rat	Newborn		Produce IGF-2	Coon, 1968
C2	Fibroblastoid	Skeletal muscle	Mouse	Embryonic		Myotubes	Morgan et al., 1992
C7	Epithelioid	Hypothalamus	Mouse			Neurophysin; vasopressin	De Vitry et al., 1974
CHO-K1	Fibroblast	Ovary	Chinese hamster	Adult	Diploid	Simple karyotype	Puck et al., 1958
COS-1, COS-7	Epithelioid	Kidney	Pig	Adult		Good hosts for DNA transfection	Gluzman, 1981
CPAE	Endothelial	Pulmonary-artery endothelium	Cow	Adult	Diploid	Factor VIII, Angiotensin II converting enzyme	Del Vecchio & Smith, 1981
HaCaT	Epithelial	Keratinocytes	Human	Adult	Diploid	Cornification	Boukamp et al., 1988
L6	Fibroblastoid	Skeletal muscle	Rat	Embryonic		Myotubes	Richler & Yaffe, 1970
LLC-PKI	Epithelial	Kidney	Pig	Adult	Diploid	Na^{+}-dependent glucose uptake	Hull et al., 1976; Saier, 1984
MDCK	Epithelial	Kidney	Dog	Adult	Diploid	Domes, transport	Gaush et al., 1966; Rindler et al., 1979
NRK49F	Fibroblast	Kidney	Rat	Adult	Aneuploid	Induction of suspension growth by TGF-α,β	De Larco & Todaro, 1978
STO	Fibroblast		Mouse	Embryonic	Aneuploid	Used as feeder layer for embryonal stem cells	Bernstein, 1975
Vero	Fibroblast	Kidney	Monkey	Adult	Aneuploid	Viral substrate and assay	Hopps et al., 1963
Continuous, from Neoplastic Tissue							
A2780	Epithelial	Ovary	Human	Adult	Aneuploid	Chemosensitive with resistant variants	Tsuruo et al., 1986
A549	Epithelial	Lung	Human	Adult	Aneuploid	Synthesizes surfactant	Giard et al., 1972
A9	Fibroblast	Subcutaneous	Mouse	Adult	Aneuploid	Derived from L929; Lacks HGPRT.	Littlefield, 1964b
B16	Fibroblastoid	Melanoma	Mouse	Adult	Aneuploid	Melanin	Nilos & Makarski, 1978
C1300	Neuronal	Neuroblastoma	Rat	Adult	Aneuploid	Neurites	Liebermann & Sachs, 1978
C6	Fibroblastoid	Glioma	Rat	Newborn	Aneuploid	Glial fibrillary acidic protein, GPDH	Benda et al., 1968

جدول ۱-۱۰: رده های سلولی پرمصرف(ادامه)

Cell line	Morphology	Origin	Species	Age	Ploidy	Characteristics	Reference
Caco-2	Epithelial	Colon	Human	Adult	Aneuploid	Transports ions and amino acids	Fogh, 1977
EB-3	Lymphocytic	Peripheral blood	Human	Juvenile	Diploid	EB virus +ve	Epstein & Barr, 1964
Friend	Suspension	Spleen	Mouse	Adult	Aneuploid	Hemoglobin	Scher et al., 1971
GH1, GH2, GH3	Epithelioid	Pituitary tumor	Rat	Adult		Growth hormone	Buonassisi et al., 1962; Yasamura et al., 1966
H4-11-E-C3	Epithelial	Hepatoma	Rat	Adult	Aneuploid	Tyrosine aminotransferase	Pitot et al., 1964
HeLa	Epithelial	Cervix	Human	Adult	Aneuploid	G6PD Type A	Gey et al., 1952
HeLa-S3	Epithelial	Cervix	Human	Adult	Aneuploid	High plating efficiency; will grow well in suspension	Puck & Marcus, 1955
HEP-G2	Epithelioid	Hepatoma	Human	Adult	Aneuploid	Retains some microsomal metabolizing enzymes	Knowles et al., 1980
HL-60	Suspension	Myeloid leukemia	Human	Adult	Aneuploid	Phagocytosis	Olsson & Ologsson, 1981
						Neotetrazolium Blue reduction	
HT-29	Epithelial	Colon	Human	Adult	Aneuploid	Differentiation inducible with NaBt	Fogh & Trempe, 1975
K-562	Suspension	Myeloid leukemia	Human	Adult	Aneuploid	Hemoglobin	Andersson et al., 1979a,b
L1210	Lymphocytic		Mouse	Adult	Aneuploid	Rapidly growing; suspension	Law et al., 1949
L929	Fibroblast		Mouse	Adult	Aneuploid	Clone of L-cell	Sanford et al., 1948
LS	Fibroblast		Mouse	Adult	Aneuploid	Grow in suspension; derived from L929	Paul & Struthers, personal communication
MCF-7	Epithelial	Pleural effusion from breast tumor	Human	Adult	Aneuploid	Estrogen receptor +ve, domes, α-lactalbumin	Soule et al., 1973
MCF-10	Epithelial	Fibrocystic mammary tissue	Human	Adult	Near diploid	Dome formation	Soule et al., 1990
MOG-G-CCM	Epithelioid	Glioma	Human	Adult	Aneuploid	Glutamyl synthetase	Balmforth et al., 1986
P388D1	Lymphocytic		Mouse	Adult	Aneuploid	Grow in suspension	Dawe & Potter, 1957; Koren et al., 1975
S180	Fibroblast		Mouse	Adult	Aneuploid	Cancer chemotherapy screening	Dunham & Stewart, 1953
SK/HEP-1	Endothelial	Hepatoma, endothelium	Human	Adult	Aneuploid	Factor VIII	Heffelfinger et al., 1992
WEHI-3B D+	Suspension	Marrow	Mouse	Adult	Aneuploid	IL-3 production	Nicola, 1987
ZR-75-1	Epithelial	Ascites fluid from breast tumor	Human	Adult	Aneuploid	ER-ve, EGFr+ve	Engel et al., 1978

سن کشت

رده‌های سلولی که دارای طول عمر کشت محدود می‌باشند، بعنوان رده‌های سلولی متناهی شناخته می‌شوند و به صورت حالت نسبتاً قابل تکثیر رفتار می‌کنند. این رده‌های سلولی دارای نسل‌های سلولی محدودی بوده و معمولاً قبل از مرگ دارای ۲۰ تا ۸۰ دو برابر شدن جمعیت می‌باشند. تعداد واقعی دو برابر شدن جمعیت، وابسته به تفاوت‌های گونه‌ای و دودمان سلولی، گوناگونی کلونال و شرایط کشت می‌باشد اما برای یک رده سلولی که در شرایط مشابه رشد می‌یابد، ثابت می‌باشد. بنابراین لازم است که رفرانس هر رده سلولی، نشان دهنده شماره نسل تقریبی یا تعداد دو برابر شدن باشد. علت

جدول ۲-۱۰: رده های سلولی که آلودگی متقاطع پیدا کرده اند

Cell line	Species	Cell type	Contaminant	Species	Cell type	Source of Data
207	Human	Pre-B leukemia	REH	Human	pre-B leukemia	DSMZ
2474/90	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colorectal carcinoma	DSMZ
2957/90	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colorectal carcinoma	DSMZ
3051/80	Human	Gastric carcinoma	HT-29	Human	Colorectal carcinoma	DSMZ
ADLC-5M2	Human	Lung carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
AV3	Human	Amnion	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC
BCC-1/KMC	Human	Basal cell carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
BM-1604	Human	Prostate carcinoma	DU-145	Human	Prostate carcinoma	DSMZ
C16	Human	Fetal lung fibroblast (MRC-5 clone)	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ECACC
CHANG liver	Human	Embryonic liver epithelium	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC; JCRB
COLO-818	Human	Melanoma	COLO-800	Human	Melanoma	DSMZ
DAMI	Human	Megakaryocytic	HEL	Human	Erythroleukemia	DSMZ
ECV304	Human	Endothelium	T24	Human	Bladder carcinoma	ATCC
ECV304	Human	Normal endothelial	T24	Human	Bladder carcinoma	DSMZ
EJ	Human	Bladder carcinoma	T24	Human	Bladder carcinoma	ATCC; JCRB
EPLC3-2M1	Human	Lung carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ; JCRB
EPLC-65	Human	Lung carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
F2-4E5	Human	Thymic epithelium	SK-HEP-1	Human	Hepatoma	DSMZ
F2-5B6	Human	Thymic epithelium	SK-HEP-1	Human	Hepatoma	DSMZ
FL	Human	Amnion	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC
GHE	Human	Astrocytoma	T-24	Human	Bladder carcinoma	DSMZ
Girardi Heart	Pig	Adult heart	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC
HAG	Human	Adenomatous goitre	T-24	Human	Bladder carcinoma	DSMZ
HEp-2	Human	Adult laryngeal epithelium	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC
HMV-1	Human	Melanoma	HeLa-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
HuL-1			HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	JCRB
IMC-2	Human	Maxillary carcinoma	HeLa-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
Intestine 407	Human	Intestine epithelium	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC
J-111			HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	JCRB
JOSK-I	Human	Monocytic leukemia	U-937	Human	Histiocytic lymphoma	DSMZ
JOSK-K	Human	Monocytic leukemia	U-937	Human	Histiocytic lymphoma	DSMZ
JOSK-M	Human	Monocytic leukemia	U-937	Human	Histiocytic lymphoma	DSMZ
JOSK-S	Human	Monocytic leukemia	U-937	Human	histolytic lymphoma	DSMZ
JTC-17			HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	Yamakage (JCRB)
KB	Human	Adult oral cavity epithelium	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC; JCRB
KO51			K562	Human	Myeloid leukemia	DSMZ; JCRB
KOSC-3			Ca9-22			JCRB

جدول ۲–۱۰: رده های سلولی که آلودگی متقاطع پیدا کرده اند(ادامه)

Cell line	Species	Cell type	Contaminant	Species	Cell type	Source of Data
L132	Human	Embryonic lung epithelium	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC
LR10.6	Human	Pre-B cell leukemia	NALM-6	Human	Pre-B cell leukemia	DSMZ
MaTu	Human	Breast carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
MC-4000	Human	Breast carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
MKB-1	Human	T-cell leukemia	CCRF-CEM	Human	T-cell leukemia	DSMZ
MKN28			MKN74			JCRB
MOLT-15	Human	T-cell leukemia	CTV-1	Human	Monocytic leukemia	DSMZ
MT-1	Human	Breast carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
NCC16			PHK16-0b			JCRB
P1-1A3	Human	Thymic epithelium	SK-HEP-1	Human	Hepatoma	DSMZ
P1-4D6	Human	Thymic epithelium	SK-HEP-1	Human	Hepatoma	DSMZ
P39 TSU	Human		HL60	Human	Myeloid leukemia	JCRB
PBEI	Human	Pre-B cell leukemia	NALM-6	Human	Pre-B cell leukemia	DSMZ
PSV811	Human	Fibroblast	WI38	Human	Fibroblast	JCRB
RAMAK-1	Human	Muscle synovium	T-24	Human	Bladder carcinoma	DSMZ
SBC-2	Human	Bladder carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
SBC-7	Human	Bladder carcinoma	HELA/-S3	Human	Cervical adenocarcinoma	DSMZ
SCLC-16H	Human	SCLC	SCLC-21/22H	Human	SCLC	DSMZ
SCLC-24H	Human	SCLC	SCLC-21/22H	Human	SCLC	DSMZ
SNB-19			U251MG	Human	Glioma	ATCC
SPI-801	Human	T-cell leukemia	K-562	Human	Myeloid leukemia	DSMZ
SPI-802	Human	T-cell leukemia	K-562	Human	Myeloid leukemia	DSMZ
TK-1	Human?		U251MG	Human	Glioma	JCRB
TMH-1			IHH-4			JCRB
WISH	Human	Newborn amnion epithelium	HeLa	Human	Cervical adenocarcinoma	ATCC

جدول ۳–۱۰: ویژگیهای رده های سلولی متناهی و پیوسته

Properties	Finite	Continuous (transformed)
Ploidy	Euploid, diploid	Aneuploid, heteroploid
Transformation	Normal	Immortal, growth control altered, and tumorigenic
Anchorage dependence	Yes	No
Contact inhibition	Yes	No
Density limitation of cell proliferation	Yes	Reduced or lost
Mode of growth	Monolayer	Monolayer or suspension
Maintenance	Cyclic	Steady state possible
Serum requirement	High	Low
Cloning efficiency	Low	High
Markers	Tissue specific	Chromosomal, enzymic, antigenic
Special functions (e.g., virus susceptibility, differentiation)	May be retained	Often lost
Growth rate	Slow (T_D of 24–96 h)	Rapid (T_D of 12–24 h)
Yield	Low	High
Control parameters	Generation no.; tissue-specific markers	Stain characteristics

تقریبی بودن شماره نسل این است که بدست آوردن تعداد تقسیم و در نتیجه شماره نسل در کشت اولیه آسان نیست.
ردههای سلولی پیوسته (جدول۱-۱۰) از کنترل پیری می‌گریزند، بنابراین شماره نسل اهمیت کمتری داشته و تعداد پاساژ از آخرین دفعه ذوب کردن از مخزن مهمتر می‌شود. بعلاوه به دلیل افزایش میزان تکثیر سلولی و دانسیته اشباع، نسبت‌های تقسیم بزرگتر می‌شود (۱:۱۰۰-۱:۲۰) و غلظت سلولی در واکشت حیاتی تر می‌شود.

معرفی رده سلولی

رده‌های سلولی جدید باید یک کد یا عنوان [مثلاً مغز انسان نرمال (NHB)] یک شماره سویه سلولی یا رده سلولی (اگر چندین رده سلولی از یک منبع مشابه منشاء گرفته اند مثلاً NHB2،NHB1 و غیره) و اگر کلون شده اند، یک شماره کلون (مثلاً NHB2-1 وNHB2-2) داشته باشند. استفاده از یک دفتر یادداشت روزانه یا فایل اطلاعاتی کامپیوتری برای ثبت اطلاعات بیوپسی‌ها یا نمونه‌ها قبل از شروع به کشت، سودمند می‌باشد. در چنین موردی شماره دسترسی در دفترچه یادداشت یا فایل کامپیوتری که شاید به یک کد حرفی شناسه پیوند دارد را می‌توان برای معرفی رده سلولی استفاده کرد. بعنوان مثال LT156 ، بیوپسی تومور ریه به شماره ۱۵۶ می‌باشد. این روش کمتر از کد حرفی یکسان که برای دو رده سلولی مختلف استفاده می‌شود ایجاد ابهام کرده و رفرانس اتوماتیک به پرونده ثبت شده رده سلولی می‌دهد.

برای رده‌های سلولی متناهی شماره دو برابر شدن جمعیت باید برآورد شده و بعد از یک ممیز نشان داده شود. مثلاً NHB2/2 و برای یک نسبت تقسیم ۱:۲ یکی یکی (مثلاً NHB2/3، NHB2/2 و غیره)، برای نسبت تقسیم ۱:۴ دو تا دو تا (NHB2/4، NHB2/2 و غیره) و به همین ترتیب اضافه شود. وقتی با یک رده سلولی پیوسته کار می‌شود، اغلب از یک شماره p در انتها استفاده می‌شود تا تعداد پاساژها پس از آخرین ذوب سلولی از فریزر را نشان دهد.

وقتی یک رده سلولی در نشریات یا گزارش‌ها مرجع می‌شود باید هر رده سلولی با قراردادن یک کد مشخص کننده آزمایشگاهی که آن رده سلولی از آنجا منشاء گرفته است در ابتدای نام رده سلولی مشخص شود (مثلاً WIبرای Wistar Institute، NCI برای National Cancer Institute، SK برای Sloan Kettering). در نشریات یا گزارش‌ها وقتی برای اولین بار رده سلولی ذکر می‌شود، در قسمت مواد و روش‌ها باید معرفی کاملی از رده سلولی آورده شود و پس از آن می‌توان از شکل مخفف آن استفاده کرد.

ضروری است که معرفی رده سلولی منحصر به فرد باشد وگرنه در گزارشهای بعدی در مقالات باعث اشتباه می‌شود. بانک‌های سلولی برای غلبه بر این مشکل به هر رده سلولی یک شماره دسترسی اختصاصی می‌دهند. شما باید در هنگام گزارش رده‌های سلولی که از بانک سلولی بدست آمده، این شماره دسترسی را در قسمت مواد و روشها بیاورید. همچنین نشانه گذاری هم وقتی یک نفر به دنبال یک رده سلولی در یک بانک اطلاعاتی می‌گردد می‌تواند باعث ایجاد مشکل شود. بنابراین همیشه از یک ترکیب استاندارد استفاده کرده و از ویرگول یا فاصله استفاده نکنید.

انتخاب رده سلولی

برای انتخاب یک رده سلولی به غیر از نیازمندیهای عملکردی خاص، تعدادی از پارامترهای کلی وجود دارند:

۱) **متناهی در مقابل پیوسته:** آیا رده سلولی پیوسته‌ای وجود دارد که عملکردهای صحیح را داشته باشد؟ معمولاً نگهداری یک رده سلولی پیوسته آسانتر بوده، سریعتر رشد کرده، خیلی آسانتر کلون می‌شود و میزان بیشتری محصول سلولی در هر فلاسک تولید می‌کند.

۲) **نرمال یا ترانسفورم شده:** آیا مهم است که رده به صورت بدخیم ترانسفورم شده باشد یا نه؟ اگر اینگونه باشد، پس ممکن است بدست آوردن یک رده نامیرا که تومورزا نباشد امکان پذیر باشد.

۳) **گونه ها:** آیا گونه‌ها مهم هستند؟ رده‌های سلولی غیرانسانی دارای محدودیت‌های مخاطرات زیستی کمتری بوده و دارای این مزیت می‌باشند که بافت اصلی ممکن است بیشتر در دسترس باشد.

۴) **خصوصیات رشد:** شما در مورد میزان رشد، راندمان، کارایی پلیتینگ و سهولت جمع آوری به چه چیزهایی نیاز دارید؟ به این منظور شما باید پارامترهای زیر را در نظر بگیرید:

a) زمان دو برابر شدن جمعیت
b) دانسیته اشباع (بازده در هر فلاسک)
c) کارایی پلیتینگ
d) نسبت رشد
e) توانایی رشد در سوسپانسیون

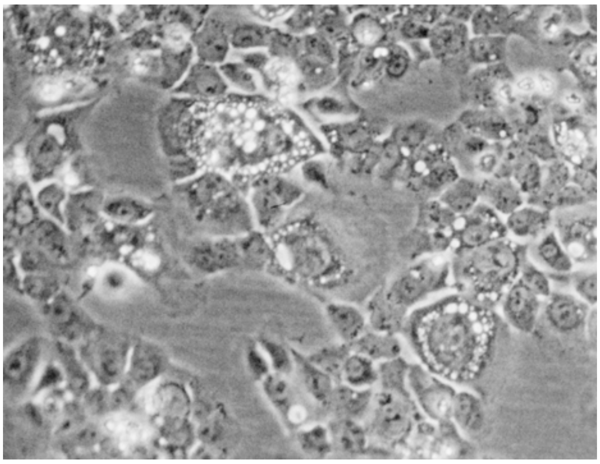
۵) **میزان دسترسی:** اگر شما مجبور به استفاده از یک رده سلولی متناهی می‌باشید آیا به اندازه کافی استوک در اختیار دارید؟ آیا شما باید خودتان رده‌های سلولی خود را تولید کنید؟ اگر شما یک رده سلولی پیوسته را انتخاب کنید آیا استوک‌های معتبر در دسترس می‌باشند؟

۶) **معتبرسازی (validation):** رده سلولی چگونه تعیین هویت شده است؟ آیا شما قادرید که تعیین هویت لازم را انجام دهید؟ آیا این رده قابل اعتماد است؟ ضروری است که قبل از شروع به کار احتمال آلودگی را رد کنیم چون در بسیاری از موارد آلودگی با سایر رده های سلولی گزارش شده است.

۷) **بیان فنوتیپی** : آیا می‌توان باعث شد که رده سلولی ویژگیهای صحیح را بیان کند؟

۸) **رده سلولی شاهد:** اگر شما از یک رده سلولی جهش یافته، ترانسفکت شده، ترانسفورم شده یا غیر طبیعی استفاده می‌کنید، آیا در صورت نیاز یک رده سلولی نرمال معادل وجود دارد؟

۹) **پایداری:** رده سلولی چگونه پایدار است؟ آیا تا به حال کلون شده است؟ اگر نه، آیا شما قادرید آن را کلون کنید و چه مدت زمانی طول می‌کشد تا این فرایند کلونینگ، استوکهای قابل استفاده و فریز شده کافی تولید کند؟



شکل ۱-۱۰: سلولهای ناسالم. حفره دار شدن و دانه دار شدن در سلولهای اپی تلیال برونش که در این مورد به دلیل ناکافی بودن محیط کشت می باشد. سیتوپلاسم سلولها مخصوصاً در اطراف هسته ها دانه دار شده و واکوئل تشکیل می شود. اگر پراکندگی سلولی نامناسب باشد ممکن است سلولها در کناره ها بیشتر منعکس کننده نور باشند.

نگهداری روزمره

پس از شروع یک کشت، خواه کشت اولیه بوده و یا یک واکشت از یک رده سلولی باشد، به تعویض متناوب محیط کشت یا غذادهی و نهایتاً در صورتیکه سلولها در حال تکثیر باشند به واکشت نیاز خواهد بود. در کشت هایی که در حال تکثیر نمی باشند، باز هم لازم است که به طور متناوب محیط کشت تعویض شود زیرا سلولها هنوز هم در حال متابولیسم هستند و مقداری از اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت مصرف یا به طور خود به خودی تجزیه خواهد شد. فواصل زمانی برای تعویض محیط کشت و واکشت برحسب میزان رشد و متابولیسم بین رده‌های سلولی مختلف متفاوت می‌باشد. رده‌های سلولی ترانسفورم شده که در حال رشد سریع می‌باشند از قبیل HeLa، معمولاً هفته‌ای یک بار واکشت داده می‌شوند و باید چهار روز پس از واکشت محیط کشت تعویض شود. رده‌های سلولی که آهسته تر رشد می‌کنند، مخصوصاً آنهایی که ترانسفورمه نشده اند، ممکن است نیاز باشد که هر دو، سه یا حتی چهار هفته یکبار واکشت داده شوند و باید محیط کشت هفته‌ای یکبار در بین واکشت‌ها تعویض شود.

اهمیت مورفولوژی سلولی

لازم است که کشت به طور منظم بررسی شده تا عدم وجود آلودگی، وضعیت سالم سلولها و فقدان هر نوع علامتی از زوال مثل ایجاد گرانولها در اطراف هسته، واکوئله شدن سیتوپلاسمی و گردشدن سلولها به همراه جدا شدن از بستر تایید شود. چنین علائمی ممکن است نشاندهنده این باشند که لازم است محیط کشت تعویض شود و یا ممکن است نشانگر مسائل جدی‌تر مثل ناکافی یا سمی بودن سرم یا محیط کشت، آلودگی میکروبی یا پیرشدن رده سلولی باشد. کم بودن محیط کشت هم ممکن است باعث آپوپتوزیس شود. در طی نگهداری روزمره، اغلب تعویض محیط کشت یا واکشت باید از اینگونه زوال جلوگیری کند، زیرا اغلب برگرداندن آن مشکل است.

تعویض محیط کشت

نیاز برای تعویض محیط کشت توسط چهارعامل مشخص می‌شود:

۱) **کاهش pH:** میزان کاهش و سطح قطعی باید در نظر گرفته شود.

وقتی که pH از ۷ به ۶/۵ کاهش می‌یابد، رشد اغلب سلولها متوقف شده و در pH بین ۶/۵-۶ مرگ سلولها شروع می‌شود، بنابراین اگر رنگ محیط کشت از قرمز به نارنجی تا زرد تغییر یافت، باید محیط کشت تعویض شود. سعی کنید میزان کاهش pH را حدس بزنید، کشتی با pH ۷ که pH آن در طی یک روز به اندازه ۰/۱ واحد کاهش داشته است اگر یک یا دو روز دیگر هم غذادهی نشود آسیب نمی‌بینند اما کشتی که در طی یک روز ۰/۴ واحد کاهش pH داشته است نیاز خواهد داشت که در عرض ۴۸-۲۴ ساعت غذادهی شود و نمی‌توان آن را در تعطیلات آخر هفته بدون غذادهی رها کرد.

۲) **غلظت سلولی:** کشت هایی که دارای غلظت سلولی بالاتر می‌باشند، سریعتر از کشت هایی که دارای غلظت کمتر

می‌باشند، محیط کشت را مصرف می‌کنند. این عامل معمولاً اما نه در همه موارد علت میزان تغییر pH می‌باشد.

۳) **نوع سلول:** معمولاً در سلولهای عادی (مثل فیبروبلاست‌های دیپلوئید) در دانسیته سلولی بالا به علت ازدحام سلولی، فقدان فاکتورهای رشد و دلایل دیگر، تقسیم سلولی متوقف می‌شود. سلولها در مرحله G_1 چرخه سلولی متوقف شده و حتی اگر به مدت دو تا سه هفته یا بیشتر رها شوند، به میزان بسیار کم رو به زوال می‌روند. هر چند سلولهای ترانسفورم شده، رده‌های سلولی پیوسته و بعضی از سلولهای جنینی، در غلظت‌های بالای سلولی به سرعت رو به زوال می روند مگر اینکه محیط کشت هر روز تعویض شده و یا سلولها واکشت داده شوند.

۴) **زوال مورفولوژیکی:** این عامل باید با بررسی‌های منظم و آشنایی با رده سلولی پیش بینی شود. اگر اجازه داده شود که زوال خیلی پیشرفت کند، این امر برگشت ناپذیر خواهد بود.

حجم، عمق و منطقه سطحی: نسبت معمول حجم محیط کشت به منطقه سطحی ۰/۲-۰/۵mL/cm^2 می باشد. حد بالایی توسط انتشار گازی از طریق لایه مایع مشخص می‌شود و نسبت بهینه، به نیاز سلولها به اکسیژن مربوط می‌باشد. سلولهایی که به O_2 زیادی احتیاج دارند در محیط کشت کم عمق (مثلاً ۲mm) و سلولهایی که به اکسیژن کمی نیاز دارند در محیط کشت عمیق (مثلاً ۵mm) بهتر رشد می‌کنند. اگر عمق محیط کشت بیش از ۵mm باشد ممکن است انتشار گازی محدود شود. در مورد کشت‌های تک لایه این مشکل را می‌توان با غلتاندن بطری یا تزریق محیط کشت و قراردادن در یک مخزن حد واسط برای تبادل گازی مرتفع کرد.

محیط کشت نگهدارنده (holding medium): یک محیط کشت نگهدارنده ممکن است زمانی استفاده شود که تحریک میتوز که معمولاً به همراه تعویض محیط کشت حتی در غلظت‌های سلولی بالا روی می‌دهد، مورد نظر ما نباشد. معمولاً محیط کشت نگهدارنده همان محیط کشت معمولی می‌باشد که غلظت سرم در آن تا ۰/۵یا ۲ درصد کاهش یافته و یا به طور کامل حذف شده است. برای محیط های کشت بدون سرم عوامل رشد و میتوژن‌های دیگر حذف می‌شوند. این حذف در اغلب سلولهای ترانسفورم نشده، از میتوز جلوگیری می‌کند. رده‌های سلولی ترانسفورم شده برای این روش نامناسب می‌باشند، چون آنها ممکن است به تقسیم خود ادامه داده یا ممکن است کشت رو به زوال بگذارد، زیرا سلولهای ترانسفورم شده در یک حالت تنظیم شده در G_1 چرخه سلولی متوقف نمی شوند.

محیط‌های کشت نگهدارنده برای نگهداری رده‌های سلولی دارای طول عمر محدود، بدون اینکه تعداد محدود نسل‌های سلولی آنها به اتمام برسد، استفاده می‌شوند. همچنین کاهش سرم و توقف تکثیر سلولی، بیان فنوتیپ تمایز یافته را در بعضی از سلولها افزایش می‌دهد. همچنین محیط‌های کشتی که برای جمع آوری نمونه‌های بیوپسی استفاده می‌شود، می‌توانند به عنوان محیط‌های کشت نگهدارنده تلقی شوند.

دستور کار۱-۱۰- غذادهی یک کشت تک لایه

طرح کلی

کشت را با چشم و یا میکروسکوپ معکوس بررسی کنید. در صورت نیاز مثلاً کاهشpH محیط کشت، محیط قبلی را خارج کرده و محیط کشت جدید اضافه کنید. کشت را مجدداً به انکوباتور برگردانید.

مواد

استریل:

کشت‌های سلولی: سلولهای A549، ۴ روز پس از بذرافشانی در دانسیته ۲×۱۰^{۴}cells/mL در فلاسک‌های ۲۵cm^2 .... ۴

محیط کشت رشد ۱۰۰mL

مثل MEM ۱× Eagles با نمکهای Hank و HCO_3 ۴ mM بدون آنتی بیوتیک

پی‌پت‌های مدرج ۱ mL، ۵ mL، ۱۰mL و ۲۵mL که توپی گذاری شده اند

پی پت‌های بدن توپی برای خارج کردن محیط کشت با پمپ یا خط خلاء

غیر استریل:

پی پت یار یا پوار

لوله برای اتصال خط خلاء

الکل ۷۰٪ در بطری اسپری

سواب‌های بدون پرز

دستمال کاغذی جاذب

سیلندر پی‌پت حاوی آب و ماده ضدعفونی کننده

ماژیک مارکر با جوهر نامحلول در الکل

دفترچه یادداشت، خودکار، دستورکار و غیره

دستور کار

۱- هود را آماده کرده و با الکل ۷۰٪سواب کنید.

۲- معرفها و مواد لازم را به زیر هود آورده، بطریها را با الکل ۷۰٪ سواب کنید.

۳- کشت را از نظر علایم آلودگی یا زوال بررسی کنید.

۴- pH و دانسیته یا غلظت سلولی را چک کرده و براساس تجربه شخصی در مورد جایگزین کردن کشت تصمیم گیری کنید. در صورت نیاز به غذادهی، به صورت زیر عمل شود.

۵- کشت را به ناحیه کار استریل انتقال دهید.
۶- در فلاسک را باز کنید.
۷- پی‌پت استریل را برداشته و در پوار یا پی پت یار قرار داده یا یک پی‌پت بدون توپی متصل به خط یا پمپ خلاء را انتخاب کنید.
۸- محیط کشت را خارج کرده و در بشر حاوی مواد زائد بریزید یا ترجیحاً محیط کشت را از طریق یک خط مکش متصل به یک پمپ خلاء خارج کنید.
۹- پی‌پت را دور بیاندازید.
۱۰- در بطری محیط کشت را بردارید.
۱۱- یک پی‌پت تازه برداشته و یک حجم از محیط کشت تازه، مساوی با حجم خارج شده که تا دمای ۳۷°C گرم شده است را به فلاسک اضافه کنید.
۱۲- پی‌پت را دور بیاندازید.
۱۳- در فلاسک و بطری محیط کشت را ببندید.
۱۴ کشت را به انکوباتور باز گردانید.
۱۵- نتایج مشاهدات و غذادهی را در دفترچه یادداشت کنید.
۱۶- تمام پی‌پت‌ها، ظروف شیشه‌ای و غیره را خارج کرده و سطح کار را سواب کنید.

نکته) وقتی یک کشت در دانسیته پایین بوده و آهسته رشد می‌کند، ممکن است ترجیح داده شود بصورت نصفه غذادهی شود، یعنی در مرحله ۸ فقط نیمی از محیط کشت خارج شده و در مرحله ۱۱ همان حجم از محیط کشت تازه به آن اضافه شود.

واکشت

وقتی یک رده سلولی واکشت داده می‌شود معمولاً رشد سلولها در کشت از یک الگوی استاندارد تبعیت می‌کند. بعد از بذرافشانی و سپس مرحله lag، یک دوره رشد نمایی به نام مرحله log وجود دارد. وقتی دانسیته سلولی (تعداد سلول در هر سانتیمتر مربع از بستر $cells/cm^2$) به اندازه‌ای رسید که کل بستر موجود اشغال شد و یا زمانی که غلظت سلولی (تعداد سلول در هر میلی لیتر کشت cells/mL) بیش از ظرفیت محیط کشت شود، رشد متوقف شده یا به میزان زیادی کاهش می‌یابد. پس یا باید محیط کشت تعویض شود و یا باید کشت تقسیم شود. در مورد یک رده سلولی چسبنده، تقسیم کردن یک کشت یا واکشت، معمولاً شامل خارج کردن محیط کشت و جداسازی سلول‌ها از تک لایه توسط تریپسین می‌باشد، هرچند برخی از سلولها که چسبندگی کمتری دارند (مثل $HeLa\text{-}S_3$) ممکن است با تکان دادن بطری، جمع آوری سلولها در محیط کشت و رقیق سازی مناسب در محیط کشت تازه در بطری‌های جدید، واکشت داده شوند. به طور استثناء، بعضی از تک لایه‌های سلولی را نمی توان توسط تریپسین جدا کرد و باید از پروتئازهای دیگر از قبیل پروناز، دیسپاز و کلاژناز استفاده کرد. از بین این پروتئازها، پروناز موثرترین آنها بوده اما برای برخی از سلولها سمی می‌باشد. دیسپاز و کلاژناز معمولاً کمتر از تریپسین سمی می‌باشند اما ممکن است باعث جداسازی کامل سلولهای اپی‌تلیال نشوند. سایر پروتئازها مثل Accutase، Accumax (پروتئاز بی مهرگان) و Trypzean یا TrypLE (تریپسین نوترکیب) موجود بوده و هنگامی که دستورکارهای تفکیک استاندارد مشکل داشته باشد یا لازم باشد که از پروتئازهای پستانداران (مثل خوک) یا باکتریها (مثل پروناز) استفاده نشود باید کارایی آنها آزمایش شود. شدت تیمار به نوع سلول بستگی داشته و باید یک دستور کار با حداقل شدت استفاده شود که با تولید یک سوسپانسیون تک سلولی با میزان زیستایی بالا سازگار باشد.

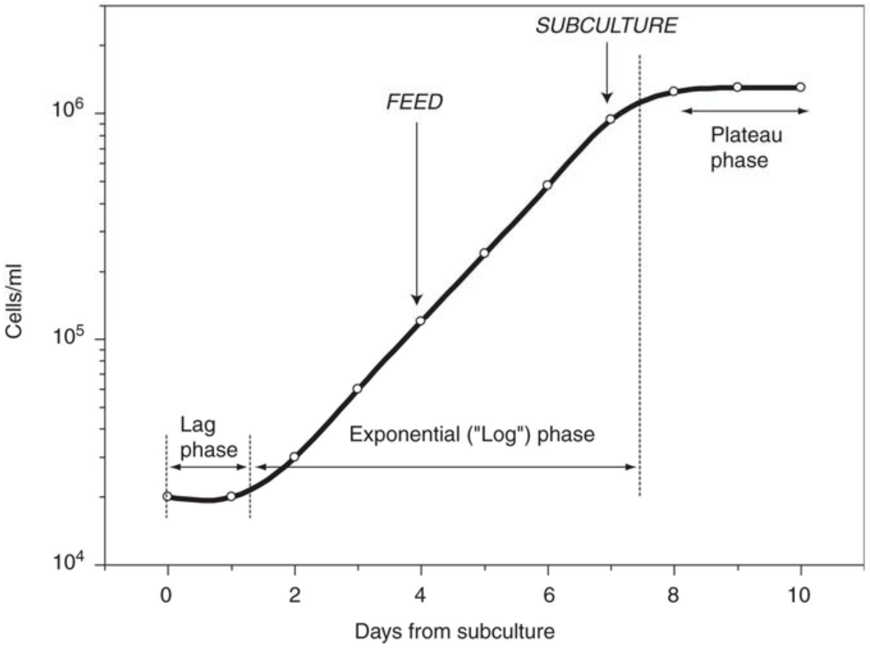
اتصال سلولها به یکدیگر و به بستر کشت توسط گلیکوپروتئینهای سطحی سلول و Ca^{2+} انجام می‌شود. پروتئینها و پروتئوگلیکانهای دیگر منشاء گرفته از سلولها و سرم با سطح سلولی و سطح بستر همراه شده و اتصال سلولی را تسهیل می‌کنند. برای واکشت معمولاً لازم است که Ca^{2+} کلاته شده و ماتریکس خارج سلولی و ملکولهای اتصال سلولی بالقوه تجزیه شوند.

معیارهای واکشت

نیاز به واکشت یک تک لایه توسط معیارهای زیر تشخیص داده می‌شود:

۱) **دانسیته کشت:** سلولهای طبیعی باید به محض اینکه به تراکم رسیدند، واکشت داده شوند. اگر بیش از۲۴ ساعت در اینحالت باقی بمانند، سلولها از چرخه خارج شده و زمانیکه مجدداً بذرافشانی می‌شوند، مدت زمان بیشتری طول می‌کشد تا بازیابی شوند. سلولهای ترانسفورم شده باید وقتی به تراکم می‌رسند واکشت داده نشوند، هرچند آنها تا بیش از حد تراکم به تکثیر ادامه خواهند داد اما بعد از حدود دو دوبرابر شدن، زوال شروع خواهد شد و بذرافشانی مجدد کاهش خواهد یافت.

۲) **تحلیل رفتن محیط کشت**: معمولاً از بین رفتن محیط کشت نشان دهنده این می‌باشد که محیط کشت باید تعویض شود، اما اگر کاهش pH سریعتر اتفاق افتد، ممکن است نیاز به واکشت باشد. معمولاً کاهش pH به همراه افزایش دانسیته سلولی می‌باشد که اولین شاخص نیاز برای واکشت می‌باشد. همچنین



شکل ۲-۱۰: منحنی رشد. نمودار نیمه لگاریتمی غلظت سلولی بر حسب زمان واکشت نشاندهنده فاز تأخیر، فاز نمایی و سکون بوده و زمان هایی که باید واکشت و غذادهی انجام شود را نشان می دهد.

توجه شود که یک کاهش سریع در pH می‌تواند در نتیجه آلودگی باشد، بنابراین آنرا چک کنید.

۳) **زمان بعد از آخرین واکشت:** اگر سلولها در زمان مناسب به دانسیته کافی نرسیده‌اند (یعنی غیر متراکم هستند)، دانسیته بذرافشانی را افزایش داده یا اگر سلولها خیلی زودتر به تراکم رسیدند، دانسیته بذرافشانی را کاهش دهید. زمانیکه این امر برقرار شد باید رشد مجدد از یک دانسیته سلولی معین از لحاظ مدت زمان و بازده یکسان باشد. انحراف از این الگو نشاندهنده یک انحراف از شرایط طبیعی بوده یا زوال سلولها را نشان می‌دهد. در حالت ایده ال باید یک غلظت سلولی یافت شود که امکان واکشت سلولها را پس از ۷ روز و تعویض محیط کشت را پس از ۴-۳ روز فراهم سازد.

دستور کار۲-۱۰- واکشت سلولهای تک لایه

طرح کلی

محیط کشت را خارج کنید. سلولها را به طور مختصر در معرض تریپسین قرار داده و انکوبه کنید. سلولها را در محیط کشت پخش کرده و شمارش کنید. واکشت را رقیق کرده و بذرافشانی مجدد نمایید.

مواد

استریل:

سلول‌های A549، ۷ روز و ۱۴ روز پس از بذرافشانی با غلظت ۲×۱۰^{۴} cells/mL در فلاسک‌های ۲۵Cm^2 از هر کدام ۱

MRC-5 ،WI-38 یا یک کشت فیبروبلاست دیپلوئید نرمال، ۷ روز و ۱۴ روز بعد از بذرافشانی در غلظت ۲×۱۰^{۴} cells/mL در فلاسک ۲۵cm^2 .... از هر کدام ۱

محیط کشت رشد MEM × ۱ با نمک‌های Earle و ۲۳mM HCO_3 بدون آنتی بیوتیک.......................... ۱۰۰mL

تریپسین ۰/۲۵٪ در D-PBSA ۱۰mL

D-PBSA با ۱mM EDTA ۲۰mL

پی‌پت‌های مدرج ۱mL، ۵mL، ۱۰mLو ۲۵mL

ظروف یونیورسال یا لوله‌های سانتریفوژ ۵۰mL ۴

فلاسک‌های کشت ۲۵cm^2 .... ۸

غیر استریل:

پی پت یار یا پوار

لوله برای اتصال به پمپ خلاء یا پمپ پریستالتیک

الکل ۷۰٪ در بطری اسپری

سواب

دستمال کاغذی جاذب

سیلندر پی‌پت حاوی آب و ماده ضدعفونی کننده

ماژیک مارکر با جوهر نامحلول در الکل

دفترچه یادداشت، مداد، دستور کار و غیره

هموسیتومتر یا دستگاه شمارشگر سلولی الکترونیکی

جدول ۴-۱۰: روشهای تفکیک سلولی

Procedure	Pretreatment	Dissociation agent	Medium	Applicable to
Shake-off	None	Gentle mechanical shaking, rocking, or vigorous pipetting	Culture medium	Mitotic or other loosely adherent cells
Scraping	None	Cell scraper	Culture medium	Cell lines for which proteases are to be avoided (e.g., receptor or cell surface protein analysis); can damage some cells and rarely gives a single-cell suspension
Trypsin* alone	Remove medium completely	0.01–0.5% Crude trypsin; usually 0.25%	D-PBSA, CMF, or saline citrate	Most continuous cell lines
Prewash + trypsin	D-PBSA	0.25% Crude trypsin	D-PBSA	Some strongly adherent continuous cell lines and many early-passage cells
Prewash + trypsin	1 mM EDTA in D-PBSA	0.25% Crude trypsin	D-PBSA	Strongly adherent early-passage cell lines
Prewash + trypsin	1 mM EDTA in D-PBSA	0.25% Crude trypsin	D-PBSA + 1 mM EDTA	Many epithelial cells, but some can be sensitive to EDTA; EGTA can be used
Trypsin + collagenase	1 mM EDTA in D-PBSA	0.25% Crude trypsin; 200 U/mL crude collagenase	D-PBSA + 1 mM EDTA	Dense cultures and multilayers, particularly with fibroblasts
Dispase	None	0.1–1.0 mg/mL Dispase	Culture medium	Removal of epithelium in sheets (does not dissociate epithelium)
Pronase	None	0.1–1.0 mg/mL Pronase	Culture medium	Provision of good single-cell suspensions, but may be harmful to some cells
DNase	D-PBSA or 1 mM EDTA in D-PBSA	2–10 μg/mL crystalline DNase	Culture medium	Use of other dissociation agents which damage cells and release DNA

*Digestive enzymes are available (Difco, Worthington, Roche, Sigma) in varying degrees of purity. Crude preparations—e.g., Difco trypsin, 1:250, or Worthington CLS-grade collagenase—contain other proteases that may be helpful in dissociating some cells, but may be toxic to other cells. Start with a crude preparation, and progress to purer grades if necessary. Purer grades are often used at a lower concentration (μg/mL), as their specific activities (enzyme units/g) are higher. Purified trypsin at 4°C has been recommended for cells grown in low-serum concentrations or in the absence of serum [McKeehan, 1977] and is generally found to be more consistent. Batch testing and reservation, as for serum, may be necessary for some applications.

دستورکار:

۱- هود را آماده کرده و معرفها و مواد و وسایل شروع کار را به داخل هود انتقال دهید.

۲- کشت را با دقت از نظر علایم آلودگی یا زوال بررسی کنید.

۳- معیارها را چک کنید (به معیارهای واکشت در این فصل رجوع شود) و بر اساس دانش شخصی در مورد رفتار کشت تصمیم گیری کنید که آیا واکشت داده یا ندهید. در صورت نیاز به واکشت مطابق روش زیر عمل شود:

۴- کشت‌ها را به یک ناحیه کار استریل برده و محیط کشت را خارج کرده و دور بریزید.

۵- D-PBSA/EDTA (۰/۲mL/cm^2) را به سطح روبروی سطح سلولی فلاسک افزوده به گونه ایکه از کنده شدن سلولها جلوگیری شود، سلولها را شستشو داده و سپس D-PBSA را خارج کنید. این مرحله برای برطرف کردن مقادیر جزئی سرم که از فعالیت تریپسین جلوگیری می‌کند و خارج کردن کاتیونهای دو ظرفیتی لازم برای اتصال سلولی در نظر گرفته شده است.

۶- تریپسین را به سطح روبروی سطح سلولی فلاسک اضافه کنید (۰/۱ mL/cm^2) فلاسک را برگردانده و روی سطح بگذارید. مطمئن شوید که تک لایه به طور کامل با تریپسین پوشیده شده است فلاسک را به مدت ۳۰-۱۵ ثانیه ثابت قرار دهید.

۷- فلاسک را بالا آورده و سریعاً چک کنید که تک لایه جدا نشده باشد. استفاده از تریپسین در دمای ۴°C از کنده شدن زودتر از موقع سلولها جلوگیری می‌کند.

۸- همه تریپسین به جز چند قطره از آن را خارج کنید.

۹- فلاسک را به صورت صاف انکوبه کرده تا زمانیکه سلولها گرد شوند؛ وقتی فلاسک کج شود باید تک لایه به سمت

پایین حرکت کند (این کار معمولاً بعد از ۱۵-۵ دقیقه روی می‌دهد). فلاسک را بیش از زمان مورد نیاز در این حالت نگه ندارید، اما از سوی دیگر سلولها را مجبور به کنده شدن قبل از اینکه آماده اینکار شوند نکنید، و گرنه ممکن است باعث تولید حالت توده‌ای شود.

نکته) در هر صورت، اصلی ترین عامل جداکننده، تریپسین یا EDTA می‌باشد که فقط به مقدار کم وجود دارد و انکوباسیون زمانی انجام می‌شود که بیشتر عامل جداکننده خارج شده است. در صورتیکه در مورد جداسازی سلولها و در نتیجه در تهیه سوسپانسیون تک سلولی با مشکلی مواجه شدید، می‌توانید از روشهای جایگزین دیگر مثل روشهایی که در جدول ۴-۱۰ شرح داده شده استفاده کنید.

۱۰- محیط کشت را اضافه کنید (mL/cm^2 ۰/۲-۰/۱) و سلولها را با پی پتینگ کردن مکرر، بر روی سطح سلولی پخش کنید.

۱۱- سرانجام چند مرتبه سوسپانسیون سلولی را در حالتیکه سر پی‌پت در گوشه کف بطری قرار دارد، پی پتینگ کرده و دقت کنید که کف ایجاد نشود. میزان پی پتینگ مورد نیاز برای رده‌های سلولی مختلف، متفاوت می‌باشد. بعضی از رده‌های سلولی به آسانی پخش می‌شوند در حالیکه برخی برای پخش شدن به پی پتینگ شدید نیاز دارند. تقریباً تمام سلولها اگر با شدت پی پت شوند متحمل آسیب مکانیکی می‌شوند؛ مخصوصاً سوسپانسیون‌های اولیه و کشت‌های پاساژ زودرس تا حدودی به دلیل اندازه بزرگتر و تا حدودی به دلیل شکنندگی بیشتر مستعد به آسیب می‌باشند اما رده‌های سلولی پیوسته، معمولاً دارای خاصیت ارتجاعی بیشتر بوده و برای جداسازی کامل به پی پتینگ شدید نیاز دارند . سوسپانسیون را به اندازه کافی به بالا و پایین پی پت کرده تا سلولها به حالت سوسپانسیون تک سلولی در آیند. در صورتی که این مرحله مشکل می‌باشد از یک عامل جداکننده قویتر استفاده کنید.

تهیه یک سوسپانسیون تک سلولی در واکشت برای اطمینان از شمارش سلولی صحیح و رشد یکنواخت در هنگام بذرافشانی مجدد مورد نظر می‌باشد. در صورتیکه قرار باشد محاسبات کمی تکثیر سلولی یا راندمان کشت بررسی شود و یا اگر هدف جداسازی سلولها به صورت کلون می‌باشد، تهیه سوسپانسیون تک سلولی ضروری می‌باشد.

۱۲- با استفاده از یک هموسیتومتر یا یک شمارشگر الکترونیکی تعداد سلولها را شمارش کنید و تعداد سلولها را یادداشت کنید.

۱۳- سوسپانسیون را تا غلظت بذرافشانی مناسب رقیق کنید.

a) با افزودن حجم مناسبی از سلولها به حجم مشخص محیط کشت در یک فلاسک کشت یا

b) با رقیق کردن سلولها تا کل حجم مورد نیاز و توزیع آن حجم در تعدادی فلاسک.

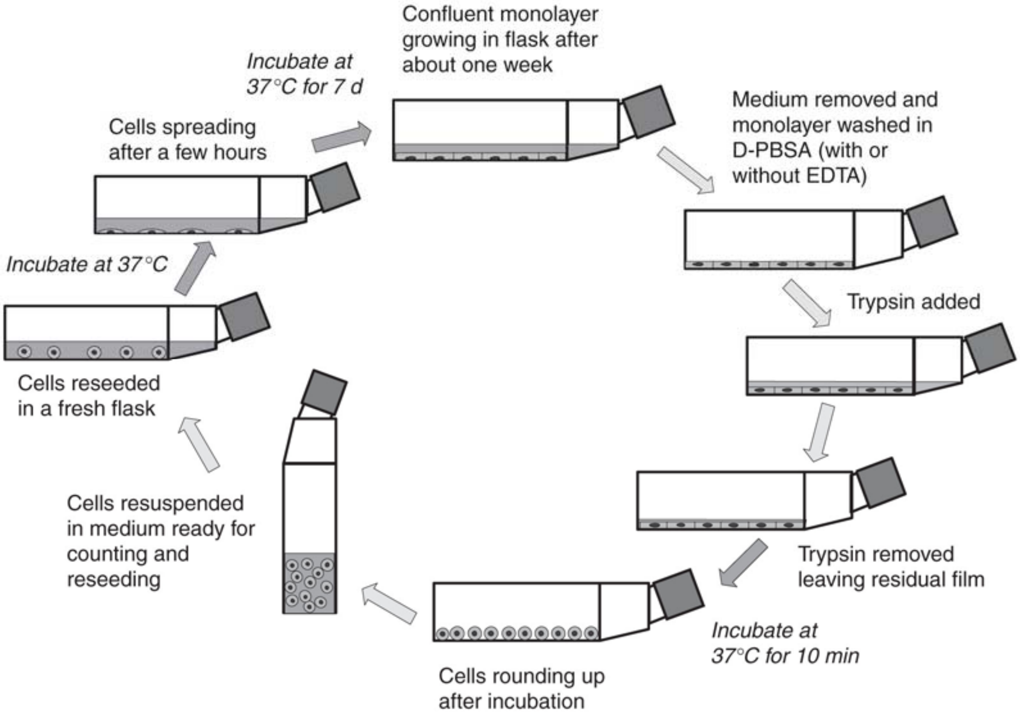
روش (a) برای واکشت‌های معمولی که فقط تعداد محدودی فلاسک استفاده می‌شود و تعداد دقیق سلولها و قابلیت تکثیر مهم نیست، مفید می‌باشد اما روش (b) زمانیکه چندین تکرار وجود دارد، چون تعداد کل دستکاریها کاهش یافته و غلظت سلولها در هر فلاسک یکسان می‌باشد، مفید می‌باشد. برای تمرین ۱۳ از روش (b) استفاده کنید : سلولهای هر فلاسک را تا ۲×۱۰^{۴} سلول در میلی لیتر در ۲۰mL محیط کشت رقیق کرده و ۵mL از هر سوسپانسیون را در دو فلاسک بذرافشانی کنید.

۱۴) در صورتیکه سلولها در غلظت‌های بالای CO_2 رشد می‌کنند، با دمیدن مخلوط گازی مناسب از یک کپسول از طریق یک خط دارای فیلتر به داخل فلاسک بالای محیط کشت، فلاسک‌ها را گازدهی کنید. گاز را وارد محیط کشت نکنید چون باعث تولید حباب می‌شود که می‌تواند بعضی از اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت را دناتوره کرده و خطر آلودگی را افزایش می‌دهد. در صورتیکه مانند محیط کشت Eagle با نمک‌های Hank فاز گاز طبیعی هوا باشد، می‌توان این مرحله را حذف کرد.

۱۵) در فلاسک‌ها را بسته و آنها را در انکوباتور قرار دهید. پس از یک ساعت آنها را از نظر تغییر pH چک کنید. اگر در محیط کشتی که دارای فاز هوا می‌باشد pH افزایش یافت، فلاسک را به ناحیه استریل برده و مقدار کمی با ۵٪ CO_2 هوادهی کنید. چون هر کشت در محیط کشت مشابه، به صورت قابل پیش بینی شده‌ای رفتار خواهد کرد سرانجام شما می‌دانید کدام سلولها را وقتی که بذرافشانی مجدد شدند بدون اینکه ابتدا آنها را انکوبه کنید گازدهی نمایید. اگر pH محیط کشتی که دارای فاز گازی ۵٪ CO_2 می‌باشد، بالا رفت میزان CO_2 را تا٪ ۷ یا ٪۱۰ افزایش داده یا به آن اسید کلریدریک ۰/۱N استریل اضافه کنید.

۱۶- این فرایند را از مرحله ۴ برای رده سلولی دوم تکرار کنید.

نکته) روش ذکر شده در مرحله ۱۵ را نباید به عنوان یک راه حل طولانی مدت برای مشکل pH بالا بعد از واکشت استفاده کرد. در صورت ادامه یافتن مشکل، در زمان ساختن محیط کشت، pH آن را کاهش داده و pH محیط کشت را در انکوباتور یا در یک فلاسک گازدهی شده چک کنید. چون افزایش هوا در درون فلاسک‌های پلاستیکی باعث می‌شود فلاسک‌های بزرگتر متورم شده و از قرار گرفتن آنها به حالت صاف جلوگیری می‌کند، ۳۰ دقیقه پس از قرار دادن فلاسک در انکوباتور با شل کردن مختصر درپوش فشار را خارج کرده و یا می‌توان با فشردن بالا و پایین فلاسک‌های بزرگ قبل از اینکه



شکل ۳-۱۰: واکشت تک لایه. مراحل واکشت و چرخه رشد سلولهای تک لایه بعد از تریپسینه کردن.

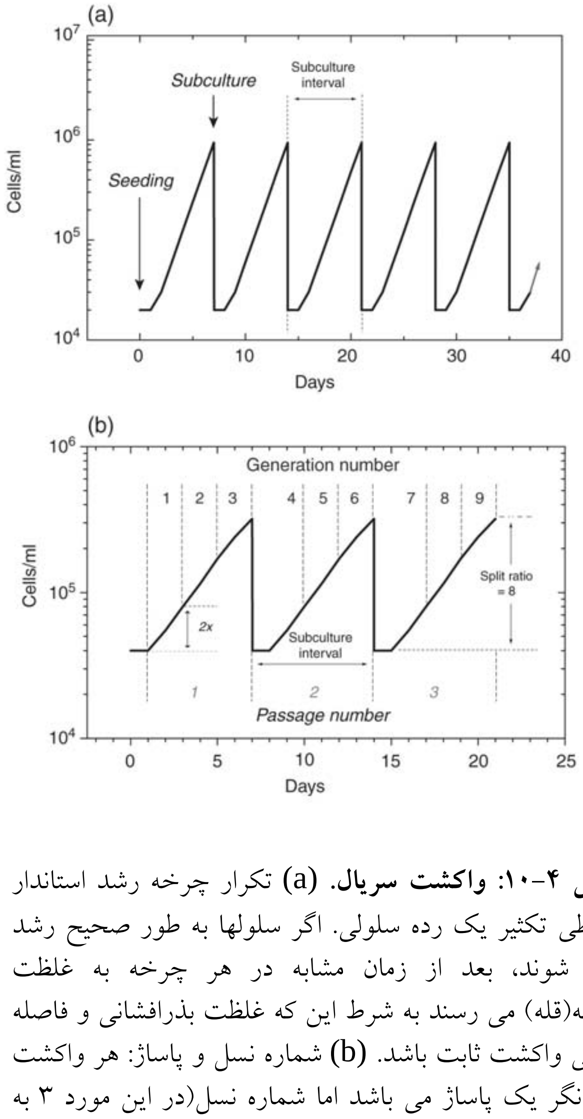
در آنها بسته شود از این مشکل جلوگیری کرد. در زمان انکوباسیون شکل فلاسک به حالت اول باز می‌گردد. مراقب باشید که فلاسک ترک نخورد.

چرخه رشد و نسبت‌های تقسیم

پاساژ معمول باعث تکرار یک چرخه رشد استاندارد می‌شود (شکل ۴-۱۰). برای هر رده سلولی مورد استفاده لازم است که با این چرخه آشنا شد زیرا این چرخه، غلظت بذرافشانی، مدت زمان رشد قبل از واکشت، مدت زمان انجام آزمایشات و زمانهای مناسب برای نمونه برداری با بیشترین ثبات را کنترل می‌کند. سلولها در مراحل مختلف چرخه رشد از لحاظ تکثیر، فعالیت آنزیمی، گلیکولیز و تنفس، ساخت محصولات اختصاصی و بسیاری از خصوصیات دیگر متفاوت می‌باشند. برای رده‌های سلولی متناهی، معمول است که غلظت سلولی را تا دو، چهار، هشت یا ده برابر (یعنی به ترتیب نسبت تقسیم ۲، ۴، ۸ و ۱۶) کاهش داد تا محاسبه تعداد دو برابر شدن‌های جمعیت آسانتر شود (یعنی به ترتیب نسبت تقسیم ۲ مربوط به ۱ ، ۴ به ۲ ، ۸ به ۳ و ۱۶ به ۴ دو برابر شدن جمعیت می‌باشد)؛ بعنوان مثال کشتی که هشت برابر تقسیم شده برای رسیدن به دانسیته سلولی مشابه به سه دو برابر شدن جمعیت نیاز دارد. همچنین یک رده کند رشد یا آسیب پذیر باید ۱:۲ تقسیم شود، در حالیکه یک رده قوی تند رشد باید به نسبت ۱:۸ یا ۱:۱۶ و بعضی از رده های سلولی پیوسته می توانند به نسبت ۱:۵۰ یا ۱:۱۰۰ تقسیم شوند. وقتی که یک رده سلولی پیوسته می‌شود (معمولاً دارای بیش از ۱۵۰ یا ۲۰۰ نسل باشد) شماره نسل نادیده گرفته شده و باید کشت بین $۱۰^۴$ و $۱۰^۵$ سلول در میلی‌لیتر رقیق شود. همچنین نسبت تقسیم یا رقت به گونه ای انتخاب می شود که برای ایجاد یک فاصله زمانی مناسب واکشت شاید ۱ یا ۲ هفته مناسب باشند و برای اطمینان از اینکه سلولها ۱) زیر غلظتی که به آنها اجازه ورود مجدد به چرخه رشد با یک دوره تاخیر (lag period) ۲۴ ساعت یا کمتر را می دهد، رقیق نشده باشند و ۲) قبل از واکشت بعدی وارد یک مرحله سکون نشوند.

وقتی که با یک رده سلولی برای اولین بار کار می‌شود و یا وقتی از یک کشت پاساژ زودرس استفاده می شود که شما در مورد آن تجربه کمی دارید، بهترین روش واکشت رده سلولی

در اولین تلاش، به نسبت تقسیم ۲ یا ۴ می‌باشد. زمانی که شما تجربه کافی بدست آوردید، امکان افزایش نسبت تقسیم یعنی کاستن از غلظت سلولی پس از واکشت وجود دارد اما زمانیکه تلاش می‌کنید که نسبت‌های تقسیم بقیه را افزایش دهید همیشه یک فلاسک را در یک نسبت تقسیم پایین نگه دارید. حتی وقتی یک نسبت تقسیم به کار برده می‌شود، باید تعداد سلولها در هر فلاسک بعد از تریپسینه کردن و در بذرافشانی مجدد ثبت شود به گونه ایکه بتوان میزان رشد در هر واکشت را تخمین زد و بتوان غلظت را مشخص کرد. در غیر اینصورت تغییرات اندک برای چندین پاساژ آشکار نخواهد شد.



شکل ۴-۱۰: واکشت سریال. (a) تکرار چرخه رشد استاندار در طی تکثیر یک رده سلولی. اگر سلولها به طور صحیح رشد داده شوند، بعد از زمان مشابه در هر چرخه به غلظت مشابه(قله) می رسند به شرط این که غلظت بذرافشانی و فاصله زمانی واکشت ثابت باشد. (b) شماره نسل و پاساژ: هر واکشت نمایانگر یک پاساژ می باشد اما شماره نسل(در این مورد ۳ به ازای هر پاساژ) به نسبت تقسیم(۸ برای ۳ دو برابر شدن در هر پاساژ) وابسته می باشد.

غلظت سلولی در واکشت

روش مناسب برای تعیین دانسیته بذرافشانی مناسب، تهیه یک منحنی رشد در غلظت‌های بذرافشانی متفاوت و سپس تعیین حداقل غلظتی می‌باشد که یک دوره تاخیر کوتاه و ورود زودتر به رشد لگاریتمی سریع (یعنی یک زمان دو برابر شدن جمعیت کوتاه) را موجب می‌شود ولی در زمانی که برای واکشت بعدی مناسب می‌باشد به اوج مرحله تصاعدی برسد.

بعنوان یک قاعده کلی، اغلب رده‌های سلولی پیوسته، در یک غلظت بذرافشانی بین $۱×۱۰^۴$ و $۵×۱۰^۴$ سلول در میلی‌لیتر به طور رضایت بخش واکشت داده می‌شوند. رده‌های سلولی متناهی در غلظت‌های تقریباً مشابه واکشت می‌شوند و بیشتر کشت‌های آسیب‌پذیر از قبیل اندوتلیوم و تعدادی از بافت‌های اپی تلیال در ابتدای پاساژ در حدود $۱×۱۰^۵$ سلول در میلی لیتر واکشت می‌شوند. برای یک کشت جدید با یک غلظت بذرافشانی بالا شروع کرده و به تدریج غلظت را کاهش داده تا زمانیکه یک چرخه رشد مناسب بدون هیچگونه زوال در کشت بدست آید.

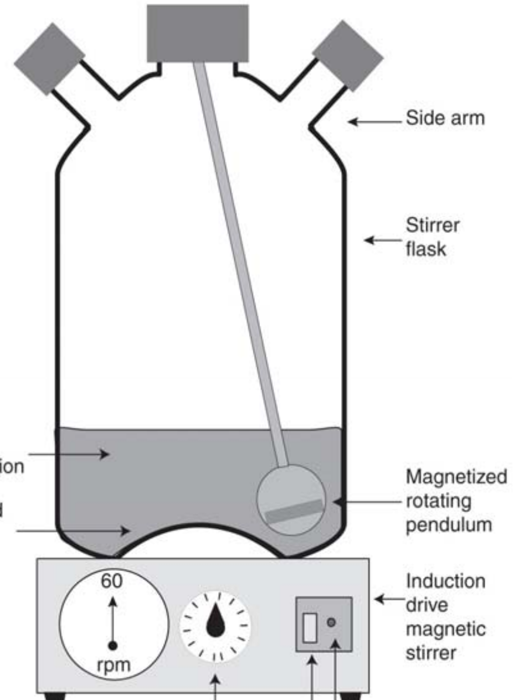
تکثیر در سوسپانسیون

دستور کار ۲-۱۰ مربوط به واکشت تک لایه‌ها می‌باشد چون اغلب کشت‌های اولیه و رده‌های پیوسته به این صورت رشد می‌کنند. سلولهایی که به طور پیوسته در سوسپانسیون رشد می‌کنند به دلیل اینکه این سلولها غیرچسبنده بوده (مثل بسیاری از لوسمی‌ها و تومورهای آسیت موشی) و یا به خاطر اینکه به صورت مکانیکی در حالت سوسپانسیون نگه داشته می‌شوند، می‌توان آنها را مانند باکتریها و مخمرها واکشت داد. این سلولها دارای مزیت هایی می‌باشند؛ بعنوان مثال به تیمار تریپسین نیاز نداشته، بنابراین واکشت سریعتر بوده و برای سلولها کمتر آسیب زا می‌باشد و افزایش مقیاس (scale up) آسانتر است. معمولاً در مورد کشت‌های سوسپانسیون، تعویض محیط کشت صورت نمی پذیرد و به جای آن یا کشت رقیق شده و توسعه می‌یابد و یا مقداری از سوسپانسیون سلولی خارج شده و باقیمانده در حد غلظت بذرافشانی مناسب رقیق می‌شود. در هر صورت یک چرخه رشد مشابه با سلولهای تک لایه اما معمولاً با یک دوره تاخیر کوتاهتر بدست خواهد آمد.

سلولهایی که خود به خود به صورت سوسپانسیون رشد می‌کنند را می‌توان در فلاسک‌های کشت معمولی نگهداری کرد و لازم نیست که این فلاسک‌ها برای کشت بافت تیمار شده باشند (هر چند باید استریل باشند). مقررات مربوط به عمق محیط کشت در کشت‌های ایستا (static cultures) همانند مقررات مربوط به کشت‌های تک لایه می‌باشد یعنی ۲-۵mm

جدول ۵-۱۰: مقایسه کشت سوسپانسیون با کشت تک لایه

Monolayer	Suspension
Culture requirements	
Cyclic maintenance	Steady state
Trypsin passage	Dilution
Limited by surface area	Volume (gas exchange)
Growth properties	
Contact inhibition	Homogeneous suspension
Cell interaction	
Diffusion boundary	
Useful for	
Cytology	Bulk production
Mitotic shake-off	Batch harvesting
In situ extractions	
Continuous product harvesting	
Applicable to	
Most cell types, including primaries	Only transformed cells



شکل ۵-۱۰: کشت در ظرف همزن دار. یک فلاسک همزن دار کوچک با ظرفیت mL ۱۰۰۰-۲۵۰. سوسپانسیون سلولی توسط یک پاندول که در ته فلاسک به صورت حلقوی می چرخد، همزده می شود.

تا امکان تبادل گازها فراهم شود. زمانیکه عمق یک کشت سوسپانسیون افزایش می‌یابد مثلاً زمانی که توسعه پیدا می‌کند، لازم است که محیط کشت همزنی شود که اینکار را می‌توان با قراردادن فلاسک کشت سلولی دارای یک پاندول مغناطیسی همزننده سوسپانسیون بر روی همزن مغناطیسی انجام داد. همچنین بطریهای غلتان که بر روی یک رک می‌چرخند برای همزدن کشت‌های سوسپانسیون استفاده می‌شوند.

واکشت کشت‌های سوسپانسیون

دستورکار۳-۱۰ واکشت معمول یک کشت سوسپانسیون را در یک ظرف جدید شرح می‌دهد. می‌توان یک کشت پیوسته را در همان ظرف اولیه نگه داری کرده اما به تدریج در طی رقیق سازی با ایجاد هرگونه پس مانده اندک در گردنه فلاسک، احتمال آلودگی به تدریج افزایش می‌یابد.

معیارهای واکشت برای کشت‌های سوسپانسیون مشابه معیارهای واکشت کشت‌های تک لایه می‌باشد.

۱) **غلظت سلولی،** که نباید برای بیشتر سلولهایی که به صورت سوسپانسیون رشد می‌کنند از ۱×۱۰^{۶} /mL بیشتر شود.

۲) **pH** که متناسب با غلظت سلولی می‌باشد.

۳) **زمان بعد از آخرین واکشت،** که همانند کشت‌های تک لایه باید متناسب با یک برنامه منظم باشد.

۴) **نیازهای تولید سلولی** برای مقاصد آزمایشی یا تولیدی

دستور کار۳-۱۰- واکشت در سوسپانسیون

طرح کلی

یک نمونه از سوسپانسیون سلولی برداشته، سلولها را شمارش کنید و یک حجم مناسب از سوسپانسیون را به محیط کشت تازه در یک فلاسک جدید اضافه کنید، غلظت سلولی را به سطح اولیه باز گردانید.

مواد

استریل:

کشت استارتر: L1210, HL-60 یا P388، ۷ روز و ۱۰ روز بعد از بذرافشانی در غلظت ۱×۱۰^{۴}cells/mL در فلاسک‌های ۲۵cm^2 .... از هر کدام۱ عدد

محیط کشت رشد مثل MEM با نمکهای spinner (S-MEM) یا RPMI 1640 با ۲۳mM $NaHCO_3$ و ۵٪ سرم گوساله.. ۲۰۰m1

پی پت‌های مدرج و توپی دار.................. ۱ کن از هر کدام

در صورتی که پی‌پت‌ها شیشه‌ای می‌باشد مجموعه‌ای از اندازه‌های ۱mL، ۵mL، ۱۰mL و ۲۵mL در یک کن مربع شکل یا اگر پی‌پت‌ها پلاستیکی می‌باشند به صورت مجزا توپی گذاری شده و برحسب اندازه در یک رک چیده شوند.

پی پت‌های بدون توپی برای خارج کردن محیط کشت توسط پمپ خلاء .... ۱ کن

ظروف یونیورسال یا لوله‌های سانتریفوژ ۵۰mL ۴

فلاسک‌های ۵۰۰mL دارای همزن با پاندول همزن مغناطیسی ۲

فلاسک‌های کشت ۲۵cm^2 .... ۴

غیراستریل:

پی پت یار یا پوار

لوله برای اتصال پمپ یا خط خلاء

الکل ٪۷۰ در بطری اسپری

سواب‌های بدون پرز

دستمال کاغذی جاذب

سیلندر پی‌پت حاوی آب و ماده ضدعفونی کننده

ماژیک مارکر با جوهر نامحلول در الکل

دفترچه یادداشت، خودکار، دستورکار و غیره

هموسیتومتر یا شمارشگر سلولی الکترونیکی

همزن مغناطیسی

دستور کار

۱- هود را آماده کرده و معرفها و مواد را به زیر هود آورده تا کار را آغاز کنید.

۲- کشت را با دقت از لحاظ علایم آلودگی و زوال بررسی کنید. این مرحله در کشت‌های سوسپانسیون از سلولهای تک لایه مشکل تر می‌باشد اما سلولهایی که در شرایط نامناسب به سر می‌برند به صورت چروکیده و یا دانه دار می‌باشند. سلولهای سالم باید شفاف وایستا به نظر رسیده و هسته آنها با میکروسکوپ فازکنتراست قابل مشاهده بوده و اغلب در یک کشت ایستا به صورت توده‌های کوچکی دیده شوند.

۳- کشت را به ناحیه کار استریل برده یک نمونه از آن را خارج کرده وتعداد سلول‌ها را در نمونه‌ها شمارش کنید.

۴- براساس ملاک هایی که قبلاً در مورد واکشت سلولهای سوسپانسیون شرح داده شد و برحسب اطلاعات شخصی در مورد واکشت دادن یا ندادن تصمیم بگیرید. در صورت نیاز به واکشت به صورت زیر عمل شود:

۵- سوسپانسیون سلولی را مخلوط کرده و هر نوع توده‌ای را با پی پتینگ کردن سوسپانسیون سلولی به بالا و پایین پخش کنید.

۶- ۵۰mL محیط کشت به هر یک از دو فلاسک همزن دار اضافه کنید.

۷- ۵mL محیط کشت به هر یک از چهار فلاسک ۲۵cm^2 اضافه کنید.

۸- مقدار کافی سلول اضافه کرده تا غلظت نهایی ۱×$۱۰^۵$ cells/mL برای سلولهای کند رشد (۴۸-۳۶ ساعت زمان دو برابر شدن) یا ۲×$۱۰^۴$cells/mL برای سلولهای تند رشد (۲۴-۱۲ ساعت زمان دو برابر شدن) بدست آید. برای سلولهایی که در قسمت مواد ذکر شده است از غلظت نهایی ۱×$۱۰^۴$cells/mL استفاده کنید.

۹- کشت را با ٪۵ CO_2 گازدهی کنید.

۱۰- در فلاسک‌ها را بسته و در انکوباتور قرار دهید. فلاسک‌ها را مانند کشت تک لایه به صورت صاف قرار دهید.

۱۱- در فلاسک‌های همزن دار را بسته و بر روی همزن‌های مغناطیسی که در ۱۰۰rpm-۶۰ تنظیم شده است در داخل یک انکوباتور یا گرمخانه در دمای ۳۷°C قرار دهید. مراقب باشید که موتور همزن باعث گرم شدن بیش از حد کشت‌ها نشود. در صورت نیاز یک فوم پلی استیرن را زیر بطری قرار دهید. همزن‌های induction-drive گرمای کمتری تولید کرده و هیچ گونه قسمت متحرکی ندارد.

کشت‌های سوسپانسیون دارای مزیت هایی می‌باشند. اولین مزیت این است که می‌توان تولید و جمع آوری مقادیر بالای سلولی را بدون افزایش دادن ناحیه سطحی بستر انجام داد. بعلاوه اگر کشت به طور پیوسته رقیق سازی شود وغلظت سلولی ثابت نگه داشته شود، می‌توان یک حالت یکنواخت ایجاد کرد. در کشت‌های تک لایه این حالت یکنواخت به آسانی بدست نمی آید. نگهداری کشت‌های تک لایه ضرورتاً چرخه‌ای بوده که باعث می‌شود میزان رشد و متابولیسم برحسب مرحله رشد متفاوت باشد.

استانداردسازی شرایط کشت

استانداردسازی شرایط کشت برای حفظ پایداری فنوتیپی ضروری می‌باشد. هر چند که ممکن است برحسب نوع آزمایش بعضی از شرایط تغییر کند، اما برای نگهداری روتین باید به شرایط تعریف شده استاندارد پایبند بود.

محیط کشت: نوع محیط کشت مصرفی بر روی انتخاب انواع سلولهای مختلف موثر بوده و بیان فنوتیپی آنها را تنظیم می‌کند. در نتیجه وقتی که یک محیط کشت انتخاب شد، آن محیط کشت استاندارد سازی می‌شود.

سرم: بهترین روش برای حذف تغییرات سرم استفاده از محیط کشت فاقد سرم می‌باشد هرچند متاسفانه هنوز فرمولاسیون‌های فاقد سرم برای همه انواع سلولها موجود نبوده و تغییر به محیط کشت بدون سرم ممکن است پرهزینه و وقتگیر باشد. ممکن است جایگزین‌های سرم ثبات بیشتری داشته باشند و معمولاً ارزانتر از سرم یا تکمیل با فاکتور رشد بوده اما کنترل بر روی محیط فیزیولوژیکی که توسط محیط‌های کشت فاقد سرم ایجاد می‌شود را ندارد. در صورت نیاز به سرم یک بچ را انتخاب کرده و در تمام مراحل کشت و همچنین

جدول ۶-۱۰: ثبت اطلاعات، غذادهی

Date . . . . *Time* . . . . *Operator* . . . .

	Date:				
Cell line	Designation				
	Primary or subculture				
	Generation or pass no.				
Status	Phase of growth cycle				
	Appearance of cells				
	Density of cells				
	pH of medium (approx.)				
	Clarity of medium				
Medium	Type				
	Batch no.				
	Serum type and concentration				
	Batch no.				
	Other additives				
	CO_2 concentration				
Other parameters					

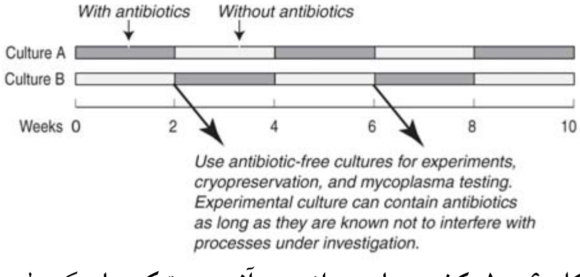
منجمد نگهداری(cryopreservation) از همان بچ استفاده کنید.

پلاستیک‌ها: اغلب، انواع فلاسک‌ها و دیش‌های کشت نتایج مشابهی خواهند داد اما ممکن است در نتیجه تیمار پلاستیک برای کشت بافت، تغییرات اندکی ایجاد شود. بنابراین ترجیح داده می‌شود که از یک نوع فلاسک یا دیش و شرکت سازنده استفاده شود.

نگهداری رده سلولی: اگر رده‌های سلولی در شرایط غیر استاندارد نگهداری شوند، ممکن است خصوصیات آنها تغییر یابد. رژیم نگهداری باید بهینه شده و سپس در طی کل کار با رده سلولی ثابت باقی بماند. همچنین باید کشت‌ها از استوک‌های فریز شده در فواصل زمانی منظم جایگزین شوند.

استفاده از آنتی بیوتیک

استفاده متوالی از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ایجاد آلودگیهای نهفته (cryptic contaminations) بخصوص میکوپلاسما و توسعه ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود. همچنین ممکن است آنتی بیوتیک با فرایندهای سلولی مورد بررسی تداخل یابد. هر چند در مواردی که آلودگی میکروبی کاملاً شایع شده و یا با رده‌های سلولی کاملاً با ارزشی کار می‌شود می‌توان از آنتی‌بیوتیک استفاده کرد. در صورت استفاده از آنتی‌بیوتیک، به منظور آشکارسازی هر نوع آلودگی نهفته باید تعدادی از استوک ها را بدون آنتی‌بیوتیک نگهداری کرد. این استوک‌ها را می‌توان به صورت موازی نگهداری کرد و تا زمانی که کشت فاقد آنتی‌بیوتیک امکان پذیر است می‌توان استوک‌ها را در حالت دارای آنتی‌بیوتیک و بدون آنتی‌بیوتیک به صورت متناوب نگهداری کرد. توصیه نمی شود که این روش به صورت یک دستورکار دائمی به کار رود و در صورتی که به یک آلودگی مزمن مشکوک شوید باید سلولها دور ریخته شده و یا آلودگی برطرف شود و سپس شما می‌توانید به نگهداری بدون آنتی بیوتیک باز گردید.



شکل ۶-۱۰: کشت های موازی و آنتی بیوتیک ها. یک طرح پیشنهادی برای نگهداری کشت های سلولی موازی با آنتی بیوتیک به گونه ای که همیشه هر کشت قسمتی از زمان بدون آنتی بیوتیک باشد.

جدول ۷-۱۰: ثبت اطلاعات، واکشت

Date . . . . *Time* . . . . *Operator* . . . .

	Date:				
Cell line	Designation				
	Generation or pass no.				
Status before subculture	Phase of growth cycle				
	Appearance of cells				
	Density of cells				
	pH of medium (approx.)				
	Clarity of medium				
Dissociation agent	Prewash				
	Trypsin				
	EDTA				
	Other				
	Mechanical				
Cell count	Concentration after resuspension (C_I)				
	Volume (V_I)				
	Yield ($Y = C_I \times V_I$)				
	Yield per flask				
Seeding	Number (N) & type of vessel (flask, dish, or plate wells)				
	Final concentration (C_F)				
	Volume per flask, dish, or well (V_F)				
	Split ratio ($Y \div C_F \times V_F \times N$), or number of flasks seeded ÷ number of flasks trypsinized, where the flasks are of same size				
Medium/serum	Type				
	Batch no.				
	Serum type and concentration				
	Batch no.				
	Other additives				
	CO_2 concentration				
Matrix coating	e.g., fibronectin, Matrigel, collagen				
Other parameters					

نگهداری مدارک

جزئیات نگهداری روتین، شامل غذادهی و واکشت باید حفظ شده و انحرافات یا تغییرات صورت گرفته باید در یادداشت‌های مربوط به رده سلولی اضافه شود. چنین مدارکی برای GLP (Good Laboratory Practice) به صورت مدارک کشت اولیه لازم است. اگر روش‌های استاندارد تعریف شده باشند، بعد از آن فقط عنوان «غذادهی شد» یا «واکشت داده شد» با ذکر تاریخ، تعداد سلولها و هر نکته‌ای در مورد ارزیابی چشمی کافی بوده و هرگونه تغییری که در روشهای استاندارد صورت گرفته باید به خوبی ثبت شود. ثبت این اطلاعات قسمتی از کار معمول کشت سلول است و تا حد امکان همه اطلاعات و یا حداقل اتفاقات مهم مثل تغییر شرکت سازنده محیط کشت، کلون شدن رده سلولی، ترانسفکت کردن و یا تغییر به محیط کشت بدون سرم باید ثبت شود.

فصل یازدهم

آلودگی

منابع آلودگی

حفظ حالت سترون هنوز یکی از مشکل ترین مسائل کشت سلولی می باشد. این مشکل در شرایط خاص حتی گریبانگیر افراد با تجربه هم خواهد شد. بنابراین داشتن اطلاعات کافی در مورد منابع آلودگی های میکروبی و تکنیک های کار سترون برای افرادی که در آزمایشگاه کشت سلولی مشغول به فعالیت هستند، ضروری می باشد. راههای ایجاد آلودگی شامل نقص در روشهای استریل کردن ظروف شیشه ای و پی پتها، اغتشاش (turbulence) و وجود گرد و غبار و اسپور در هوای اطاق کشت، نگهداری بد انکوباتورها و یخچالها، لامینارفلو معیوب، وارد کردن رده های سلولی یا بیوپسی های آلوده به آزمایشگاه و تکنیک های نامناسب می باشد. احتمالاً مورد آخر از همه مهمتر می باشد.

تکنیک کاربر

اگر معرف ها استریل بوده و وسایل در حالت صحیح استفاده شوند، آلودگی به عمل متقابل تکنیک کاربر با شرایط محیطی وابسته خواهد بود. اگر مهارت و سطح مراقبت کاربر بالا باشد و فضا تمیز و عاری از ذرات گرد و غبار باشد، آلودگی به ندرت رخ خواهد داد. بر عکس اگر وضعیت محیط نامناسب باشد(مثلاً در نتیجه کار ساختمانی یا افزایش رطوبت فصلی) و یا اگر تکنیک کاربر دچار انحراف شود (با حذف یک یا تعدادی از احتیاطات ظاهراً غیر ضروری) احتمال آلودگی افزایش می یابد. در صورتیکه هر دو این موارد به صورت همزمان یا یکی پس از دیگری روی دهند، نتایج می تواند فاجعه انگیز باشد.

محیط

محیطی که در آن کشت سلولی انجام می شود باید کاملاً تمیز و عاری از اغتشاش و ازدحام باشد. تجهیزاتی که از انبار وارد می شود و جریان هوایی که از درها، یخچالها، سانتریفوژها و حرکت کارکنان حاصل می شود، خطر آلودگی را افزایش می دهد. بنابراین، افراد باید محیط را تمیز و عاری از ازدحام نگه داشته و هر چیزی را که وارد آزمایشگاه می شود کاملاً پاک کنند.

استفاده و نگهداری از هود لامینارفلو

متداولترین حالت تکنیک نامناسب، استفاده نادرست از هود لامینارفلو می باشد. اگر هود با بطریها و وسایل پر ازدحام شود، جریان هوای لامینار به هم ریخته و لایه مرزی محافظ میان کاربر و اتاق از دست می رود. این کار باعث ورود هوای غیر استریل به داخل هود و آزادسازی مواد بالقوه خطرناک زیستی به داخل اتاق کشت می شود. بعلاوه خطر برخورد بین پی پت های استریل و سطوح غیر استریل، بطریها و غیره افزایش می یابد. افراد باید فقط وسایل و مواد مورد نیاز را به درون هود انتقال دهند و از بردن وسایل اضافی و دست و پاگیر خودداری کنند. همچنین هودهای لامینارفلو باید به طور مرتب نگهداری و تعمیر شده و باید سالم بودن فیلترها و ایمنی اتاقکهای آنها که هم به سرعت هوای درونی و هم اغتشاش بیرونی مربوط می باشد، حداقل سالی دو بار توسط افراد با صلاحیت بررسی شود.

انکوباتورهای مرطوب

یک منبع عمده آلودگی ناشی از استفاده از انکوباتورهای مرطوب می باشد. وجود رطوبت و درجه حرارت مناسب در این انکوباتورها برای رشد بسیاری از میکروارگانیسم ها مطلوب

می باشد. در صورتی که از فلاسکهای کاملاً بسته (sealed flasks) استفاده می شود، بهتر است که آنها را در انکوباتورهای خشک یا گرمخانه (hot room) قرار داد. استفاده از درپوش های نفوذ پذیر، خطر آلودگی را کاهش داده اما باعث افزایش هزینه ها می شود. برای کاهش خطر آلودگی باید انکوباتورهایی انتخاب شوند که همه سطوح آن به آسانی در دسترس بوده و بتوان آن را به راحتی تمیز کرد. کشت هایی که در انکوباتور هستند را باید در یک جعبه پلاستیکی قرار داد.

انکوباتورهایی که دارای روکش مسی هستند، رشد قارچها را کاهش خواهند داد، اما معمولاً حدود ۳۰-۲۰٪ گرانتر از نمونه های معمولی می باشند. قرار دادن فویل مسی در سینی آب باعث ممانعت از رشد قارچ در سینی می شود اما قادر به حفاظت از دیواره های انکوباتور نمی باشد. تعدادی از مواد تأخیر دهنده رشد قارچ که به طور متداول استفاده می شوند شامل سولفات مس، ریبوفلاوین، سدیم دودوسیل سولفات(SDS) و Rocall (یک ماده ضد قارچ که بصورت محلول ۲٪ استفاده می شود) می باشد. بسیاری از این مواد جزء دترژنت ها می باشند بنابراین نباید CO_2 یا هوا در مایع حاوی آنها دمیده شود چون باعث کف کردن آنها می شود. به خاطر داشته باشید که قارچ کش ها فقط سینی را محافظت کرده و هیچ جایگزین مناسبی برای تمیز کردن منظم وجود ندارد.

انکوباتورها را باید به طور منظم با استفاده از Rocall ۱۰٪ یا یک دترژنت ضد قارچی مشابه تمیز کرد. وقتی انکوباتور در حال استفاده می باشد باید هرگونه پس مانده بلافاصله برداشته شده و تمیز شود و همچنین به محض اینکه مشخص شد کشتی آلوده است باید بلافاصله از انکوباتور خارج و دور ریخته شود.

مخازن سرد

در آب و هوای مرطوب یخچالها و سردخانه ها مستعد به آلودگی قارچی برروی دیواره ها می باشند. یخچالها و سردخانه ها به دلیل ماهیت مرطوب مستعد به آلودگی قارچی می باشند. هوای مرطوب باعث افزایش خطر ته نشینی اسپورها روی بطریهای موجود در یخچال می شود. بنابراین قبل از اینکه این بطریها را وارد محیط کنیم باید با الکل سواب کرد. هر چند ماه یکبار باید دیواره ها و قفسه های مخازن سرد را با مواد ضد عفونی کننده تمیز کرد.

مواد استریل

اگر کنترل کیفیت مناسب در آزمایشگاه و یا توسط شرکت سازنده انجام پذیرد، نباید هیچگونه خطر آلودگی وسایل و معرف های استریل وجود داشته باشد. هر چند گاهی اوقات ممکن است اشتباهاتی در این کار صورت پذیرد بعنوان مثال هنگامی که تراکم وسایل در آون یا اتوکلاو خیلی زیاد بوده به گونه ای که باعث ایجاد مکان سرد(cold spot) شود، بسته بندی سوراخ شده باشد یا علیرغم انجام کنترل کیفیت، آلودگی دارای تیتر کم تشخیص داده نشود.

حفاظت در برابر این احتمالات با انجام روش های صحیح و بررسی کنترل کیفیت دقیق امکان پذیر است. وقتی افراد جدید وارد آزمایشگاه کشت بافت می شوند، لازم است که با روشهای استریلیزاسیون آشنا شوند، حتی اگر قرار نیست که خودشان این کارها را انجام دهند. همچنین آنها باید از محل و فرق بین استوک های استریل و غیر استریل آگاه باشند. یک خطای ساده توسط یک فرد تازه کار می تواند باعث مشکلات شدید شود که قبل از کشف می تواند برای چند روز طول بکشد.

رده های سلولی و بیوپسی های وارد شده

هر ماده جدید که از فرد دهنده (donor) و یا آزمایشگاههای دیگر وارد آزمایشگاه کشت سلولی می شود باید به عنوان ماده آلوده فرض شده و تا زمانی که ثابت شود فاقد آلودگی می باشد در قرنطینه نگهداری شود. ترجیحاً می توان یک اتاق مجزا را برای دریافت نمونه از کشت های وارد شده به آزمایشگاه در نظر گرفت. اگر امکان این کار وجود نداشته باشد باید جدای از دیگر کشت ها و ترجیحاً در انتهای روز و در یک هود اختصاصی با آنها کار شود و هود را بعد از استفاده با ضد عفونی کننده فنولی ۲٪ در الکل ۷۰٪ سواب کرده و سپس باید آن را تا روز بعد از سرویس خارج کرد. همه رده های سلولی باید از یک بانک سلولی معتبر که آنها را از لحاظ آلودگی میکروبی غربالگری می کند تهیه شوند. رده های سلولی فراهم شده از منابع دیگر، همانند بیوپسی حیوانات و انسان را باید تا زمانی که خلاف آن ثابت نشود به صورت آلوده در نظر گرفت.

انواع آلودگی میکروبی

باکتریها، قارچها، مخمرها، کپک ها و میکوپلاسماها و گاهی همگی در آلوده کردن کشت های سلولی نقش دارند. همچنین اگر کارهای پروتوزئولوژی در همان آزمایشگاه انجام شود، بعضی از پروتوزئرها هم قادر به آلوده کردن سلولها می باشند. معمولاً تشخیص دقیق نوع و گونه عفونت مهم نمی باشد، مگر اینکه آلودگی متداول شود. فقط لازم است که نوع عمومی آلوده کننده (مثلاً باکتری میله ای یا کوکسی، مخمر و غیره)، طرز تشخیص، مکانی که برای آخرین بار در آنجا با کشت کار شده و نام اپراتور ذکر شود. اگر یک نوع خاصی از آلودگی به طور مکرر رخ دهد، ممکن است تشخیص آن به منظور یافتن منشاء آلودگی مفید باشد.

بررسی آلودگی

حتی در بهترین آزمایشگاهها هم آلودگی رخ داده و بنابراین روشهای زیر توصیه می شود:

۱)هر بار که با یک کشت کار می شود آنرا از لحاظ آلودگی، با چشم غیر مسلح و همچنین توسط میکروسکوپ بررسی کنید. همچنین از لحاظ آلودگی میکوپلاسمایی هر ماه یکبار بررسی شود.

۲)اگر کشت شما مشکوک به آلودگی بود و آلودگی آن آشکار نبود، هود یا نیمکت محل کار را کاملاً تخلیه کرده و یک نمونه از کشت مشکوک برداشته و آنرا روی لام میکروسکوپی قرار دهید. به دلیل خطر بالقوه برای کشت های دیگر، بهتر است این کار را بعد از اتمام همه کشت های دیگر انجام دهید. لامل را با یک میکروسکوپ ترجیحاً کنتراست بررسی کنید. اگر تأیید شد که کشت شما آلوده است، پی پت ها را از جریان کار خارج کرده، هود یا نیمکت محل کار را با الکل ۷۰٪ حاوی یک ضد عفونی کننده فنولی سواب کنید و آنها را تا روز بعد از سرویس خارج کنید.

۳)ماهیت آلودگی را ثبت کنید.

۴)اگر آلودگی تازه بوده و هنوز گسترش نیافته است، کشت، بطری حاوی محیط کشتی که برای غذادهی به آن استفاده شده و بطریهای دیگر(مثلاً بطری تریپسین)که در تماس با کشت آلوده بوده اند را دور بریزید. همه اینها را در یک ماده ضدعفونی کننده، ترجیحاً در داخل یک هود شیمیایی و خارج از ناحیه کشت بافت بریزید.

۵)اگر آلودگی جدید بوده و گسترش یافته است (یعنی حداقل در دو کشت مختلف)، همه محیط های کشت، محلولهای استوک، تریپسین و غیره را دور بریزید.

۶)اگر آلودگی مشابه قبلاً اتفاق افتاده است، محلولهای استوک را از لحاظ آلودگی a) با انکوباسیون آنها به تنهایی یا در نوترینت براث و b) با کشت دادن محلول روی نوترینت آگار بررسی کنید. اگر با وجود نتیجه منفی این بررسی ها هنوز به آلوده بودن آنها مشکوک بودید، ۱۰۰mL از محلول را انکوبه کرده، سپس آنرا توسط یک فیلتر ۰/۲µm صاف کرده و نمونه صاف شده را روی نوترینت آگار کشت دهید و در کنار آن از یک نمونه شاهد منفی که تلقیح نشده است هم استفاده کنید.

۷)اگر آلودگی گسترده، چند گونه ای(multispecific) و تکرار شونده باشد، روشهای استریلیزاسیون آزمایشگاه (مثل درجه درجه حرارت های آون ها و اتوکلاوها بخصوص در مرکز بار، مدت دوره استریلیزاسیون، بسته بندی ها، روش های ذخیره سازی و بی عیب بودن اتاقک و فیلتر های هود لامینارفلو را بررسی کنید.

۸)برای آلودگی زدایی کشت ها تلاش نکنید، مگر اینکه غیر قابل جایگزین باشند.

آلودگی میکروبی قابل مشاهده

ویژگیهای آلودگی میکروبی به صورت زیر می باشد:

۱)یک تغییر ناگهانی در pH، معمولاً در مورد اغلب عفونتهای باکتریایی یک کاهش pH، در آلودگی مخمرها یک تغییر خیلی کم تا زمانیکه آلودگی زیاد شود و در مورد آلودگی قارچی گاهی اوقات یک افزایش در pH.

۲)کدورت محیط کشت، گاهی اوقات به همراه یک لایه نازک یا کف یا نقاطی روی سطح رشد که با حرکت فلاسک پخش می شوند.

۳)زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی کم (۱۰۰×~) فضاهای بین سلولی به صورت دانه دار به نظر رسیده و ممکن است در عفونت باکتریایی بدرخشند(شکل ۱a-۱۱). مخمرها به صورت ذرات گرد یا بیضی شکل مجزا به نظر می رسند که ممکن است اجسام کوچکتری از آنها جوانه زده باشد(شکل ۱b-۱۱). قارچها میسلیوم رشته ای ضخیم (شکل ۱c-۱۱) و گاهی اوقات توده های متراکم تری از اسپورها تولید می کنند. در عفونت سمی، مقداری از زوال سلولها آشکار خواهد بود.

۴)زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی بالا(۴۰۰×~) ممکن است تشخیص باکتریهای اختصاصی و تشخیص بین کوکسی و میله ای امکان پذیر باشد. در این بزرگنمایی، به دلیل حرکت باکتریها، درخشندگی قابل مشاهده می باشد. بعضی از باکتریها با سلولهای کشت شده تشکیل دستجات یا گروههایی را می دهند.

۵)با تهیه یک لام می توان مورفولوژی باکتریها را در بزرگنمایی ۱۰۰۰× بررسی کرد اما معمولاً نیازی به این کار نمی باشد. ممکن است عفونت میکروبی با رسوب اجزاء تشکیل دهنده محیط کشت(مخصوصاً پروتئین ها)یا با بقایای سلولی (cell debris) اشتباه شود، اما آلودگی میکروبی را می توان با مورفولوژی منظمی که دارد از آنها تشخیص داد. رسوبات ممکن است به صورت کریستاله یا دانه دار و نامنظم بوده و معمولاً از لحاظ اندازه به صورت یکنواخت نمی باشند. اگر هنوز نسبت به آلودگی مشکوک هستید، یک نمونه از محیط کشت را روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) کشت دهید.

میکوپلاسماها

میکوپلاسماها کوچکترین پروکاریوتهایی هستند که دارای زندگی آزاد بوده و توانایی خود تکثیری (self-replicating) را دارند. میکوپلاسماها فاقد دیوار سلولی بوده و توانایی سنتز آنرا ندارند. آنها دارای قطر حدود ۰/۳µm بوده و به اشکال رشته ای یا کروی دیده می شوند. اندازه ژنوم

آنها تقریباً ۱/۶ ژنوم *E.coli* است. میکوپلاسما یک اصطلاح کلی است که به ارگانیسم های رده میکوپلاسماتالها (mycoplasmatales) اطلاق می شود که قادرند کشت های سلولی را آلوده کنند. در این مورد خانواده های میکوپلاسماتاسه (mycoplasmataceae) و آکوله پلاسماتاسه (acholeplasmataceae) از اهمیت خاصی برخوردارند.

آلودگی میکوپلاسمایی عموماً توسط یکی از پنج گونه متداول ایجاد می شود. این میکروارگانیسم ها و میزبانهای طبیعی آنها به صورت زیر می باشند:

M. hyorhinis (خوک)
M. arginini (گاو)
M. orale (انسان)
M. fermentants (انسان)
A. laidlawii (گاو)

غلظت میکوپلاسماها در سوپرناتانت می تواند در حدود $۱۰^۶$-$۱۰^۸$ میکوپلاسما در هر میلی لیتر باشد. همچنین میکوپلاسماها جذب سلولهای میزبان خواهند شد. آنها لزوماً مثل اغلب عفونت های باکتریایی و قارچی با تغییر pH و یا ایجاد کدورت در محیط کشت، خودشان را آشکار نخواهند کرد. نشان داده شده است که میکوپلاسماها اثرات متفاوتی برروی سلولها دارند که شامل:

۱) اختلالات کروموزومی
۲) القاء تغییرات مورفولوژیکی
۳) کاهش میزان رشد سلولها
۴) تغییر در متابولیسم اسیدهای نوکلئیک و اسیدهای آمینه
۵) القاء تغییرات غشایی و حتی ترانسفورماسیون سلولی

هر چند علیرغم این تأثیرات آشکار، به دلیل اینکه در چنین آزمایشگاههایی اغلب رده های سلولی، آلوده به میکوپلاسماها هستند، معمولاً آلودگی میکوپلاسمایی بررسی نمی شود. تشخیص آلودگی میکوپلاسمایی مشکل بوده و نیازمند استفاده از تکنیک های خاص می باشد. در گذشته فقط آزمایشگاههای تخصصی از قبیل کلکسیون های کشت این آزمایشات را انجام می دادند. هر چند امروزه، انواع گوناگونی از کیت های تجاری موجود است که به راحتی قادر به آشکار سازی میکوپلاسما در کشت های سلولی می باشند.

اغلب علائم ظاهری آلودگی میکوپلاسمایی مزمن شامل کاهش مقدار تکثیر سلولی، کاهش دانسیته اشباع و ایجاد آگلوتیناسیون در کشت سوسپانسیون می باشد. عفونت حاد باعث تخریب کامل سلولها شده و یا تعداد کمی کلنی مقاوم باقی مانده که این سلولها و هر رده سلولی حاصل لزوماً عاری از آلودگی نبوده و ممکن است یک عفونت مزمن را به همراه خود داشته باشد.

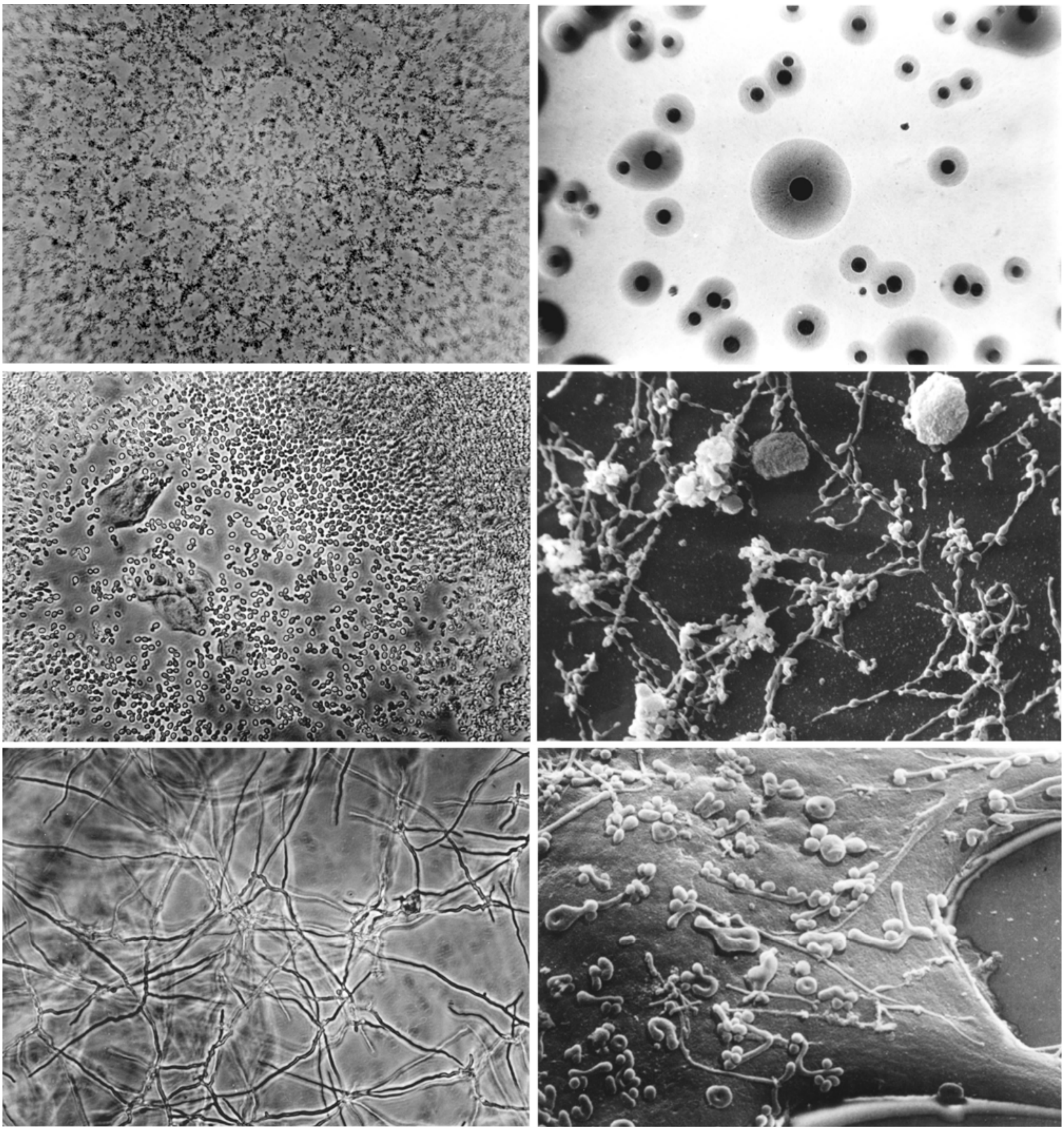
حضور آلودگی وسیع میکوپلاسمایی به دلیل عوامل زیر می باشد:

۱- مقاومت به اغلب آنتی بیوتیک های مورد استفاده در کشت بافت
۲- آلودگی میکوپلاسمایی معمولاً توسط خواص ماکروسکوپی یا توسط میکروسکوپ نوری استاندارد قابل تشخیص نمی باشد.
۳- به نظر می رسد که میکوپلاسما در آئروسل ها و معرف های کشت سلولی آلوده، زنده مانده و در نتیجه، آلودگی میکوپلاسمایی می تواند در آزمایشگاه سریعاً بین کشت ها انتشار یافته و غربالگری روتین کشت ها برای جلوگیری از این امر ضروری می باشد.

تعدادی از تکنیک های سنجش برای تشخیص آلودگی میکوپلاسمایی وجود دارد. این آزمون ها شامل رنگ آمیزی فلورسنت، PCR، آزمون الیزا، رنگ آمیزی ایمنی (immunostaining)، اتورادیوگرافی و آزمونهای میکروبی می باشد. برای حذف نتایج مثبت و منفی کاذب، حداقل از دو روش باید استفاده شود.

رنگ آمیزی فلورسنت DNA توسط رنگ Hoechst 33258، ساده ترین و مطمئن ترین روش شناسایی آلودگی میکوپلاسمایی می باشد و میکوپلاسماها را به صورت ذرات یا رشته های فلورسانس در سیتوپلاسم سلولها آشکار می سازد. هسته سلولهای کشت شده نیز توسط این روش به صورت درخشان رنگ شده و بنابراین بعنوان یک کنترل مثبت در رنگ آمیزی به کار می روند. اغلب آلودگی های میکروبی دیگر را نیز می توان با رنگ آمیزی فلورسانس آشکار کرد، به گونه ایکه سطوح کم آلودگی یا مخصوصاً ارگانیسم های کوچک از قبیل میکروکوکسیها را آشکار می کند.

حضور میکوپلاسماها همیشه با تغییرات ماکروسکوپی سلولها یا محیط کشت همراه نمی باشد. بسیاری از آلوده کننده ها میکوپلاسمایی، بخصوص در رده های سلولی پیوسته، به آهستگی رشد کرده و باعث تخریب سلولهای میزبان نمی شوند، هرچند توسط راههای بسیار متفاوتی قادر به تغییر متابولیسم سلولهای کشت یافته می باشند. چون میکوپلاسماها تیمیدین را از محیط کشت دریافت می کنند، کشت های آلوده شده، به صورت غیر طبیعی با $[^3H]$-تیمیدین نشان دار می شوند. همچنین مطالعات ایمنولوژیکی می تواند بطور کامل در نتیجه آلودگی میکوپلاسمایی ناکام بماند زیرا ممکن است تلاش برای تولید آنتی بادی علیه سطح سلولی، آنتی بادی های ضد میکوپلاسما را افزایش دهد. میکوپلاسماها قادرند رفتار و متابولیسم سلولی را با روشهای مختلفی تغییر دهند، بنابراین برای آشکارسازی آلودگیهای مخفی کشت های سلولی، مخصوصاً رده های سلولی پیوسته یک نیاز مبرم به آزمونهای روتین دوره ای وجود دارد.



شکل ۱-۱۱: انواع آلودگی. مثال هایی از میکروارگانیسم هایی که کشت های سلولی را آلوده می کنند. (a)باکتری. (b) مخمر. (c) کپک. (d)کلنی های میکوپلاسما که بر روی نوترینت آگار مخصوص رشد یافته است. (f)و (e)طرح میکروسکوپ الکترونی اسکنینگ از میکوپلاسما که بر روی سطح سلولهای کشت داده شده رشد یافته است.

اصول رنگ آمیزی فلورسنس میکوپلاسماها

رنگ فلوروکروم Hoechst 33258 به طور اختصاصی به DNA باند می شود. کشت های آلوده با میکوپلاسما در زیر میکروسکوپ فلورسنس به صورت هسته های فلورسنت با DNA میکوپلاسمایی خارج هسته ای دیده می شوند در صورتیکه کشت های سلولی غیر آلوده حاوی هسته های فلورسنت در یک زمینه منفی می باشند.

میکوپلاسماها به صورت اشکال رشته ای که ممکن است تعدادی منشعب بوده و نشان دهنده مرحله رشد لگاریتمی است و یا بصورت ذرات کوکسی که وجه مشخصه میکوپلاسماهای مسن می باشد، دید می شوند. بعضی از نمونه ها ممکن است دارای فلورسنس خارج هسته ای باشند که توسط هسته های در حال تجزیه ایجاد شده و نباید با میکوپلاسماها اشتباه شود. معمولاً فلورسنس این نوع از لحاظ اندازه یکنواخت نبوده و بسیار بزرگتر از میکوپلاسما می باشد. همچنین باکتریها و قارچهای آلوده کننده سلولها با این روش رنگ می شوند اما درخشانتر و بزرگتر از میکوپلاسماها به نظر می رسند. اگر مقدار ضایعات سلولی زیاد باشد می توان ابتدا محیط کشت را با یک فیلتر ۵μm صاف کرد و یا در ۱۰۰g سانتریفوژ کرد. مهمترین مزیت این روش رنگ آمیزی این است که نتایج سریع بدست آمده و می توان با این روش سویه های *M. hyorhinis* که تا کنون قادر به کشت آنها نبوده ایم را در کشت سلولی مشخص کرد. اسلایدهای مثبت و منفی را می توان بدون اینکه خراب شوند برای مدت چند هفته در تاریکی نگهداری کرد.

کشت های سلولی تک لایه را می توان بطورمستقیم فیکس و رنگ آمیزی کرد اما در مورد کشت های سوسپانسیون، ابتدا آنها را سانتریفوژ کرده و سپس محیط کشت آنها را به یک تک لایه سلولی اندیکاتور که عاری از میکوپلاسما می باشد، و همچنین میزبان خوبی برای میکوپلاسما بوده، به خوبی در کشت منتشر شده و دارای سیتوپلاسم کافی برای آشکارسازی میکوپلاسماهای چسبنده می باشد، اضافه می کنیم. سلولهای Vero، 3T6، NRK، A549 همگی برای این منظور مناسب می باشند.

مزایای استفاده از سلولهای اندیکاتور شامل:

۱- استانداردسازی سیستم

۲- افزایش دادن نواحی سطحی سیتوپلاسم برای آشکارسازی میکوپلاسما

۳- غربالگری میکوپلاسما در سرم و معرف های دیگر کشت سلولی

یک رده اندیکاتور مناسب، رده سلولی کلیه میمون سبز آفریقاییVero می باشد که دارای نسبت بالای سیتوپلاسم به هسته می باشد. سلولهای اندیکاتور، ۲۴-۱۰ ساعت قبل از تلقیح در غلظت حدود $۱×۱۰^{۴}$ cells/mL به لاملهای استریل در دیش های کشت بافت افزوده می شوند. نمونه مورد آزمایش باید در غلظت حدود $۵×۱۰^{۵}$ cells/mL سلول در میلی لیتر افزوده شده تا در زمان مشاهده تشکیل یک تک لایه نیمه متراکم (semi- confluent) را بدهند.

حضور میکوپلاسما در کشت های سلولی، نامطلوب بوده به گونه ای که ممکن است برروی کیفیت داده های تحقیق مؤثر باشد. وجود میکوپلاسما در رده های سلولی مورد استفاده در تهیه محصولات درمانی پزشکی قابل قبول نمی باشد، زیرا بعضی از گونه های میکوپلاسما بیماری زا بوده یا ممکن است مواد فعال زیستی تولید کنند. بعلاوه حضور هر سویه ای از میکوپلاسما، منجر به افزایش خطر آلودگی محصولات حاصل از کشت سلولی با آنتی ژنها و یا DNA میکوپلاسما می شود.

دستور کار۱-۱۱- آشکارسازی فلورسانس میکوپلاسما

طرح کلی

سلول‌ها را به مدت حداقل یک هفته در غیاب آنتی‌بیوتیک کشت داده، محیط کشت سوپرناتانت را به یک کشت اندیکاتور که در ابتدای مرحله لگاریتمی می‌باشد، انتقال داده، به مدت ۵-۳ روز انکوبه کرده، سلول‌ها را ثابت و رنگ کرده و به دنبال فلورسانس خارج هسته‌ای بگردید.

مواد

استریل یا تهیه شده به طریق استریل:

محیط کشت سوپرناتانت فاقد آنتی‌بیوتیک از یک کشت سلولی ۷ روزه تک لایه یا سوسپانسیون سانتریفوژ شده.

سلول‌های اندیکاتور (مثل A549,Vero, NRK, 3T6)

پتری دیش‌های ۶cm

غیراستریل:

رنگ Hoechst 33258، ۵۰ng/mL در BSS بدون فنل‌رد (BSS-PR) یا D-PBSA

BSS-PR: Hank's BSS بدون فنل رد

D-PBSA: Dulbecco's PBS بدون Mg^{2+} و Ca^{2+}

آب دیونیزه

ثابت کننده: استیک متانول تازه تهیه شده (۱:۳ بر روی یخ)

مونتانت گلیسرول بافری شده

دستور کار

۱-سلول‌های اندیکاتور را بدون استفاده از آنتی‌بیوتیک در پتری‌دیش‌ها بذرافشانی کنید؛ مقدار کافی از آنها را بذرافشانی کرده تا در ۵-۴ روز به تراکم ٪۶۰-۵۰ برسند (مثلاً NRK $۲×۱۰^{۴}$ یا A549 $۱×۱۰^{۵}$ در ۵mL محیط کشت).

۲-۱/۵mL محیط کشت از کشت مورد آزمایش اضافه کنید.

۳-کشت را تا زمانی که سلول‌ها به ٪۶۰-۵۰ تراکم برسند انکوبه کنید.

نکته) کشت‌ها نباید تا انتهای آزمون به تراکم برسند، زیرا از رنگ شدن ممانعت شده و مشاهده بعدی میکوپلاسما دچار مشکل می‌شود.

۴-محیط کشت را خارج کرده و دور بریزید.

۵-تک لایه را با BSS-PR یا D-PBSA شستشو داده و مایع را دور بریزید.

۶-BSS-PR یا D-PBSA تازه که با ثابت کننده به نسبت ۵۰ : ۵۰ رقیق شده است را افزوده، تک لایه را شستشو داده و مایع حاصل از شستشو را دور بریزید.

۷-ثابت کننده خالص را اضافه کرده، شستشو داده و مایع حاصل را دور بریزید.

۸-ثابت کننده بیشتری افزوده ($\sim$ ۰/۵ mL/cm^2) و به مدت ۱۰ دقیقه ثابت کنید.

۹-ثابت کننده را خارج کرده و دور بریزید.

۱۰-در صورتی که قرار است تک لایه ذخیره شود آن را کاملاً خشک کنید (ممکن است در این مرحله نمونه‌ها جمع‌آوری شده و بعداً رنگ‌آمیزی شوند).

۱۱-در صورتی که قرار است به طور مستقیم رنگ شوند، ثابت کننده را با آب دیونیزه شستشو داده و مایع حاصل را دور بریزید.

۱۲-Hoechst 33258 در BSS-PR یا D-PBSA را اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق رنگ کنید.

۱۳-رنگ را خارج کرده و دور بریزید.

۱۴-تک لایه را با آب شستشو داده و مایع حاصل را دور بریزید.

۱۵-یک لامل را در یک قطره از مونتانت گلیسرول بافری شده مونت کرده و هرگونه مقدار اضافی را از لبه‌های لامل پاک کنید.

۱۶-تک لایه را توسط اپی فلورسانس با یک فیلتر تهییج ۳۳۰/۳۸۰nm (excitation filter) و یک فیلتر مانع LP ۴۴۰nm (barrier filter) بررسی کنید.

تجزیه و تحلیل: به دنبال فلورسنس خارج هسته‌ای بگردید. میکوپلاسماها به صورت اجسام کوچک یا رشته‌های فلورسنس در بیرون سیتوپلاسم و گاهی در فضاهای داخل سلولی دیده می‌شوند. این اجسام کوچک تقریباً در محدوده تفکیک با یک عدسی شیئی ×۵۰ (۰/۱-۱μm) بوده و معمولاً از لحاظ اندازه و شکل منظم می‌باشند. لزوماً تمام سلول‌ها آلوده نخواهند بود، بنابراین تا حد امکان قبل از اظهارنظر در مورد آلوده نبودن کشت، باید مقدار بیشتری از نمونه بررسی شود.

گاهی اوقات رنگ‌آمیزی روشن و یکنواخت سیتوپلاسم مشاهده می‌شود که شاید به دلیل حضور RNA می‌باشد. این فلورسنس در هنگام ذخیره‌سازی نمونه محو شده و بررسی روز بعد (بعد از ذخیره‌سازی خشک و در تاریکی) معمولاً نتایج آشکارتری می‌دهد. این حالت مصنوعی، هرگز ظاهر مشخص یا رشته‌ای میکوپلاسما را نداشته و با کارآزمودگی بیشتر در مشاهده، نسبتاً به آسانی قابل تشخیص می‌باشد.

در صورتی که هرگونه شکی در تفسیر آزمایش فلورسنس وجود داشت، باید بعد از تهیه واکشت دیگری از سلول‌های مورد آزمایش در غیاب آنتی‌بیوتیک، آزمایش تکرار شود. اگر باز هم نتایج دارای ابهام بود، از آزمون دیگری مثل PCR یا الیزا استفاده کنید.

PCR برای میکوپلاسما

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) یک آزمون حساس و اختصاصی را برای تشخیص مستقیم میکوپلاسما در کشت سلولی فراهم می سازد. چندین توالی پرایمر برای هر دو PCR معمولی و nested PCR با اختصاصیت محدود یا گسترده برای میکوپلاسما یا گونه‌های یو باکتریها تهیه شده است. در اغلب موارد توالی های ۱۶S r DNA به عنوان توالی‌های هدف استفاده می‌شوند زیرا این ژن حاوی نواحی دارای توالی‌های کم یا بیش حفاظت شده‌ای می‌باشد. همچنین این ژن امکان انجام PCR با ۱۶ S rDNA یا RT-PCR با cDNA مربوط به 16S rRNA را فراهم می‌سازد.

ما در اینجا استفاده از یک مخلوطی از الیگونوکلئوتیدها را برای تشخیص اختصاصی میکوپلاسماها شرح می‌دهیم. این روش به میزان زیادی نتایج مثبت کاذب که به دلیل آلودگی احتمالی محلولهای مورد استفاده برای تهیه نمونه و PCR و مواد دیگر با باکتری‌های موجود در هوا می‌باشد را کاهش می‌دهد. یک از مهمترین مشکلات مربوطه به واکنش‌های PCR نمونه‌های کشت سلولی، ممانعت از فعالیت Taq پلیمراز توسط مواد نامشخص می‌باشد. برای حذف این مهارکننده‌ها، توصیه می‌شود که نمونه DNA توسط روش استخراج مرسوم فنول کلروفورم یا روش‌های استخراج مناسب‌تر استخراج و خالص‌سازی شود.

برای تایید تهیه بدون خطا نمونه و PCR، باید واکنش‌های کنترلی مناسب در PCR وجود داشته باشد. این کنترل‌ها شامل کنترل DNA داخلی برای هر نمونه واکنش و به موازات آن واکنش‌های کنترل مثبت و منفی و همچنین آب می‌باشد. این کنترل داخلی شامل یک قطعه DNA با توالی‌های پرایمری مشابه برای تکثیر اما با اندازه متفاوت از آمپلیکون نمونه‌های آلوده به میکوپلاسما می‌باشد. این DNA کنترل به مخلوط PCR در یک رقت محدود کننده مشخص افزوده شده تا حساسیت واکنش PCR را نشان دهد.

دستور کار۲-۱۱- تشخیص میکوپلاسما با PCR

مواد

D-PBSA: ۱۳۷ mM NaCl، ۲/۷mM KCL، ۸/۱mM Na_2HPO_4، ۱/۵mM KH_2PO_4، pH ۷/۲، در دمای ۱۲۱°C اتوکلاو شده تا محلول استریل شود.

۵۰× TAE (Tris acetic acid EDTA): ۲ M Tris base، استیک گلاسیال (v/v)٪ ۵/۷۱، ۱۰۰mM EDTA تا pH~ ۸/۵ تنظیم شود.

سیستم استخراج و خالص‌سازی DNA مثل استخراج فنول/کلروفورم و رسوب‌گذاری با اتانول یا کیت‌های استخراج DNA که برای ماتریکس‌های باند شونده به DNA به کار می‌رود

ترمال سایکلر

Taq DNA پلیمراز

بافرلودینگ ۶ × : (w/v) ٪۰/۰۹ بروموفنول بلو، (w/v) ٪ ۰/۰۹ گزیلن سیانول FF، گلیسرول(v/v) ٪۶۰، ۶۰mM EDTA

پرایمرها

5′ primers (Myco-5′):
cgc ctg agt agt acg twc gc
tgc ctg **r**gt agt aca ttc gc
cgc ctg agt agt atg ctc gc
cgc ctg ggt agt aca ttc gc

3′ primers (Myco-3′):
gcg gtg tgt aca a**r**a ccc ga
gcg gtg tgt aca aac ccc ga

(**r** = مخلوط g و a)

(**w** = مخلوط t و a)

محلول‌های استوک پرایمر: ۱۰۰ μM در dH2O، در دمای ۲۰- °C به صورت منجمد ذخیره می‌شود. محلول‌های کار: مخلوط پرایمری فوروارد هر کدام در غلظت 5μM (Myco-5′) و مخلوط پرایمرهای معکوس هر کدام در غلظت 5μM (Myco-3′) در dH2O که درمقادیر کم (مثلاً مقادیر ۵۰-۲۵μM) توزیع شده و در دمای ۲۰°C- به حالت منجمد نگهداری می‌شود.

DNA کنترل داخلی: باید یک رقت محدود کننده به صورت آزمایشی با انجام PCR با یک مجموعه از DNA کنترل داخلی تعیین شود.

DNA کنترل مثبت: یک رقت ۱۰ برابر از هرگونه نمونه مثبت از لحاظ میکوپلاسما که به صورت زیر تهیه می‌شود.

مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (مخلوط dNTP): مخلوط حاوی داکسی آدنوزین تری فسفات (dATP)، داکسی سیتیدین تری فسفات (dCTP)،داکسی گوانوزین تری فسفات (dGTP) و داکسی تیمیدین تری فسفات (dTTP) در غلظت ۵μM در آب و به صورت مقادیر ۵۰μL در دمای ۲۰°C- ذخیره می‌شود.

آگارز ٪۱/۳ - ژل TAE.

دستور کار

A- جمع‌آوری نمونه و تهیه DNA

۱-رده سلولی مورد آزمایش از لحاظ آلودگی میکوپلاسمایی باید قبل از جمع‌آوری نمونه‌ها، برای چند روز یا حداقل برای دو هفته بعد از ذوب کردن، بدون هیچگونه آنتی‌بیوتیک کشت داده شود. این کار این اطمینان را می‌دهد که تیتر میکوپلاسما در محیط کشت سوپرناتانت در حد تشخیص آزمون PCR می‌باشد.

۲-1mL از محیط کشت سوپرناتانت سلول‌های چسبیده یا از کشت سلول‌های سوسپانسیون ته‌نشین شده را جمع‌آوری کنید. جمع‌آوری نمونه‌ها به این روش شامل تعدادی سلول زنده یا مرده می‌باشد و بعضی از سویه‌های میکوپلاسما به سلول‌های یوکاریوتی چسبیده یا حتی به آنها حمله می‌کنند. محیط کشت سوپرناتانت را می‌توان در دمای ۴°C به مدت چند روز یا در دمای ۲۰°C- به مدت چند هفته ذخیره کرد. بعد از ذوب کردن باید بلافاصله نمونه‌ها استفاده شوند.

۳-محیط کشت سوپرناتانت به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ شده و سپس رسوب مجدداً با ورتکس کردن در ۱mL از D-PBSA به حالت تعلیق در می‌آید.

۴-سوسپانسیون مجدداً سانتریفوژ شده و یکبار دیگر مانند مرحله ۳ با D-PBSA شستشو داده می‌شود.

۵-بعد از سانتریفوژ کردن، مجدداً رسوب با ورتکس کردن در ۱۰۰μL از D-PBSA به حالت معلق درآمده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه تا ۹۵°C گرم می‌شود.

۶-بلافاصله پس از لیز کردن سلول‌ها، DNA توسط روش استخراج فنول/کلروفورم و ته‌نشینی با اتانول یا روش‌های جداسازی DNA دیگر استخراج و خالص‌سازی می‌شود.

B- واکنش PCR

برای جلوگیری از انتقال DNA باید از قوانین خاصی تبعیت شود: i) مکان‌هایی که DNA استخراج می‌شود، واکنش PCR انجام می‌شود و بعد از PCR ژل ران می‌شود باید از یکدیگر جدا باشند ii) تمام معرف‌ها باید در مقادیر کم ذخیره شده تا یک منبع دائمی از معرف‌های غیرآلوده فراهم باشد iii) از تکثیر مجدد اجتناب شود iv) از پی‌پت‌ها، سرسمپلرها و لوله‌ها فقط برای PCR استفاده شود و پی‌پت‌ها اغلب با نور UV پرتوتابی شوند v) از توالی PCR در زیر به طور کامل تبعیت شود vi) در طی تهیه نمونه و انجام PCR از دستکش استفاده شود vii) از واکنش‌های کنترلی مناسب از قبیل واکنش کنترل داخلی، مثبت، منفی و آب استفاده شود.

۱-برای هر نمونه مورد آزمایش دو واکنش با محلول‌های زیر تهیه کنید:

فقط نمونه: dNTPs ۱µL، MyCo-5′ ۱µL، MyCo-3′ ۱µl ، PCR buffer ۱۰× ۱/۵µl، dH_2O ۹/۵µL.

نمونه و استاندارد داخلی DNA: dNTPs ۱µL، MyCo-5′ ۱µL، MyCo-3′ ۱µL ، PCR buffer ۱۰× ۱/۵ µL، dH۲O ۸/۵ µL و DNA ۱µL کنترل داخلی.

چندین نمونه استوک شامل سه نمونه برای واکنش کنترل داخلی بدون DNA (برای کنترل‌های مثبت، منفی و آب) و دو تا برای DNA کنترل داخلی برای کنترل‌های مثبت و منفی به اضافه یک نمونه اضافی برای پی‌پتینگ مخلوط کنید.

۲–۱۴µL از هر استوک مخلوط شده را به لوله‌های واکنش PCR با حجم ۰/۲mL انتقال داده و dH_2O ۱µL به واکنش کنترل آب اضافه کنید.

۳-مخلوط Taq DNA پلیمر از (۱۰µL در هر واکنش به اضافه یک واکنش اضافی برای پی‌پتینگ) حاوی بافر PCR ۱× و ۱ واحد Taq پلیمراز برای هر واکنش را تهیه کنید.

۴-همه معرف‌های مورد استفاده برای تهیه استوک‌های مخلوط شده را آماده کنید.

۵-نمونه‌های DNA مورد آزمایش و DNA کنترل مثبت را بردارید. با معرف‌ها و نمونه‌ها به طور همزمان کار نکنید.

۶-به ازای هر نمونه DNA ۱µL به یک لوله واکنش که دارای هیچگونه DNA کنترل داخلی نمی‌باشد و یک لوله حاوی DNA کنترل داخلی اضافه کنید.

۷-برای انجام یک hot start PCR، مخلوط واکنش (بدون Taq پلیمراز) را به ترمال سایکلر انتقال داده و یک چرخه را با پارامترهای زیر شروع کنید:

مرحله ۱: ۷ دقیقه در دمای ۹۵°Cمرحله ۲: ۳ دقیقه در دمای ۷۲°C

مرحله ۳: ۲ دقیقه در دمای ۶۵°C مرحله ۴: ۵ دقیقه در ۷۲°C

در طی مرحله ۲ در دستگاه را باز کرده و ۱۰µL مخلوط Taq پلیمراز به هر لوله اضافه کنید. برای تعداد زیاد نمونه‌ها، زمان این مرحله می‌تواند طولانی شود. هر لوله واکنش را به صورت مجزا باز و بسته کنید تا از تبخیر نمونه‌ها جلوگیری شود. حداقل ۳۰ ثانیه بعد از افزودن Taq پلیمراز به لوله آخر وقت داده و در دستگاه ترمال سایکلر را برای تعادل درجه حرارت در داخل لوله‌ها ببندید.

۸-بعد از این مرحله ابتدایی، ۳۲ چرخه حرارتی را با پارامترهای زیر انجام دهید:

مرحله ۱: ۴ ثانیه در دمای ۹۵°C

مرحله ۲: ۸ ثانیه در دمای ۶۵°C

مرحله ۳: ۱۶ ثانیه در دمای ۷۲°C

به اضافه ۱ ثانیه زمان گسترش (extension time) در طی هر چرخه.

۹-واکنش را با یک مرحله تکثیر نهایی دردمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه تمام کرده و سپس نمونه‌ها را تا درجه حرارت اتاق سرد کنید.

۱۰-یک ژل آگارز TAE– ۱/۳٪ حاوی µg ۰/۳ اتیدیوم بروماید در هر میلی لیتر تهیه کنید. ژل را در TAE غوطه‌ور کرده و ۱۲µL محصول تکثیر (۱۰ µL مخلوط واکنش به اضافه ۲ µL از بافر لودینگ × ۶) به هر یک از چاهک‌ها اضافه کرده و ژل را در ۱۰V/cm ران کنید.

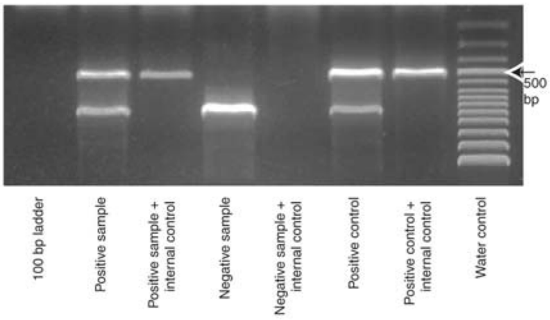
۱۱-محصولات اختصاصی را بر روی یک صفحه لامپ UV مناسب قابل دید کرده و نتایج را ذخیره کنید.

تفسیر نتایج

۱)در شرایط بهینه، همه نمونه‌های حاوی DNA کنترل داخلی یک باند در ۹۸۶bp نشان می‌دهند. در صورتی که در ران دوم هم باندی برای نمونه و کنترل داخلی مشاهده نشد، کل دستور کار را باید تکرار کرد.

۲)نمونه‌های مثبت از لحاظ میکوپلاسما، بر حسب گونه میکوپلاسما یک باند در ۵۰۲ تا ۵۲۰ bp نشان می‌دهند.

۳)آلودگی معرف‌ها با DNA میکوپلاسما یا محصول PCR با یک باند در نمونه کنترل آب و یا در نمونه کنترل منفی آشکار می‌شود. باندهای ضعیف اختصاصی میکوپلاسما، بعد از تیمار کشت‌های سلولی آلوده با معرف‌های ضدمیکوپلاسما برای حذف میکوپلاسما یا وقتی که آنتی‌بیوتیک‌های دیگر به طور روتین استفاده می‌شوند، می‌تواند مشاهده شود.



شکل ۲-۱۱: تشخیص میکوپلاسما توسط PCR. فلورسانس اتیدیوم بروماید محصولاتPCR سلولهای آلوده ، غیر آلوده و شاهد که بر روی آگارز ٪ ۱/۳ الکتروفورز شده اند. نردبان bp-۱۰۰ شامل باندهای زیر می باشد: ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰(باند شدید رنگ شده)، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۳۱، ۱۲۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰bp. باندهای میکوپلاسمای نوع وحشی حدود ۵۱۰ bp و باند کنترل داخلی حدود ۱۰۰۰ bp می باشد.

دراین‌گونه موارد واکنش مثبت ممکن است درنتیجه DNA باقی مانده در محیط کشت مشتق از سلول‌های میکوپلاسما مرده بوده و یا مربوط است به سلول‌های میکوپلاسما که در تیتر بسیار پایین می‌باشند.

روش‌های دیگر برای تشخیص میکوپلاسما

روش‌های بیوشیمیایی: در میان روش‌های دیگری که برای تشخیص آلودگی‌های میکوپلاسمایی گزارش شده است، روش‌هایی وجود دارد که آنزیم‌های اختصاصی میکوپلاسما از قبیل آرژنین دی‌آمیناز یا نوکلئوزید فسفوریلاز را آشکار می‌سازد و روش‌هایی که سمیت با ۶- میتل پورین داکسی ریبوزید را مشخص می‌سازد.

کشت میکروبیولوژیکی: یک روش بسیار حساس بوده که به طور گسترده در کنترل کیفی و روش‌های تاییدی به کار می‌رود. هر چند باید فقط وقتی استفاده شود که وسایل جداسازی و تجربه مناسب میکروب شناسی وجود داشته باشد، چون این میکروارگانیسم‌ها کاملاً سخت رشد هستند و لازم است که میکوپلاسما زنده به عنوان یک کنترل مثبت کشت داده شود. سلول‌های کشت داده شده در محیط کشت میکوپلاسما براث بذرافشانی شده، به مدت ۶ روز رشد یافته و بر روی نوترینت آگار (NA) اختصاصی کشت داده می‌شود. کلنی‌ها در عرض ۸ روز تشکیل شده و آنها را می‌توان از لحاظ اندازه (حدود ۲۰۰μM قطر) و مورفولوژی «تخم‌مرغ نیمرو» با مرکز متراکم و اطراف روشن‌تر، تشخیص داد. کیت‌های تجاری برای تشخیص میکروبیولوژیکی از شرکت Irvine Scientific به نام Mycotrim موجود می‌باشد.

هر چند استفاده از شرایط کشت انتخابی و بررسی مورفولوژی یک کلنی، ما را قادر به تشخیص گونه میکوپلاسما می‌سازد، روش کشت میکروبیولوژی در مقایسه با تکنیک فلورسنس طولانی‌تر و مشکل‌تر می‌باشد. در حال حاضر آنتی‌بادی‌های تک دودمانی اختصاصی، امکان تعیین هویت آلودگی‌های میکوپلاسمایی را فراهم می‌سازد.

دو رگه‌سازی ملکولی: کاوشگرهای ملکولی اختصاصی برای DNA میکوپلاسما می‌تواند در آنالیزهای لکه‌گذاری ساترن (Southern blot) برای تعیین آلودگی توسط تکنیک‌های دو رگه‌سازی ملکولی مرسوم استفاده شود. کیتی وجود دارد که از کاوشگرهای مشابه و یک جداسازی تک مرحله‌ای ساده از هیبرید DNA برای تشخیص بعدی توسط شمارش سنتیلاسیون (scintillation counting) استفاده می‌کند.

ترکیب [^{3}H] تیمیدین ([^{3}H] thymidin incorporation): یک روش دیگر که به طور کاملاً موفقیت‌آمیز استفاده می‌شود، اتورادیوگرافی با [^{3}H] تیمیدین می‌باشد. کشت به مدت یک شب با ۴KBq/mL (~ ۰(/۱μCi/mL) از [^{3}H] تیمیدین با فعالیت ویژه بالا انکوبه شده و یک اتورادیوگراف تهیه می‌شود. وجود دانه‌ها بر روی سیتوپلاسم نشانه آلودگی می‌باشد که می‌تواند همراه عدم نشاندار شدن هسته‌ای به دلیل حبس شدن تیمیدین در سطح سلولی توسط میکوپلاسما باشد.

پروتوزوآ

در مجموع میزان آلودگی کشت های سلولی با پروتوزئرها پایین است اما اگر فرد با بافت هایی مثل بافت های انسانی و کلیه یا کلون میمون کارکند، میزان آلودگی بالاتر است. تعدادی از پروتوزئرهای آلوده کننده کشت های سلولی شامل Acanthamoeba، Giardia، Leishmania، Naeglaria و Trypanosoma می باشند.

ویروسها

رده های سلولی وارد شده، محصولات خنثی از قبیل سرم در محیط های کشت و آنزیمهایی مثل تریپسین که برای واکشت استفاده می شود، همگی منابع بالقوه آلودگی ویروسی می باشند. بعضی از معرف ها توسط شرکت های سازنده در برابر انواع محدودی از ویروسها غربالگری می شوند و ادعا می شود که با فیلتر کردن آنها، ویروسهای بزرگ خارج می شوند، اما در حال حاضر هیچ راه مطمئنی وجود ندارد تا بتوان از آلودگی ویروسی جلوگیری کرد.

احتمالاً غربالگری توسط آنتی بادیها در رنگ آمیزی ایمنی (immunostaining) یا آزمون الیزا، بهترین روش تشخیص عفونت ویروسی می باشد. همچنین ممکن است ازPCR با پرایمرهای مناسب استفاده شود. ویروسهایی که دارای CPE (cytopathologic effect) می باشند را می توان به آسانی در کشت سلولی مشخص کرد اما عدم وجود CPE قطعاً دلیل عدم آلودگی ویروسی نمی باشد زیرا ممکن است ویروسهای پایا(persistent) یا نهانی(latent) در رده های سلولی وجود داشته و تا زمانیکه آزمایشات ایمونولوژیکی، سیتولوژیکی، فراساختمانی(ultrastructural) و یا بیوشیمیایی انجام نپذیرد، غیرقابل تشخیص باشند.

متأسفانه برای هر گروه از ویروسها و برای ویروسهای خاص، تست های جداگانه ای مورد نیاز می باشد. بدون وجود چنین غربالگری هایی، قادر به شناسایی ویروسهای نهانی کهCPE یا جذب گلبول قرمز واضحی را نشان نمی دهند، نمی باشیم. تعدادی از این ویروسها می توانند برای کارکنان کشت سلولی خطرناک باشند. بعنوان مثال ویروس Hantaan عامل بیماری تب خونریزی دهنده کره ای، در تومور و رده های سلولی دیگر تکثیر می شود. همه گیری بیماری در افراد در معرض کلنی های آلوده

رت های آزمایشگاهی، بطور جداگانه در ۵ کشور گزارش شده است. رده های سلولی ATCC، توسط تکثیرPCR به همراه یک آزمایشSlot blot برای غشاء و توالیهایGAG نسبت به HIV-1 غربالگری می شوند.

ریشه‌کنی آلودگی

باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها

مطمئن‌ترین روش حذف یک آلودگی میکروبی دور ریختن کشت و معرف‌هایی می‌باشد که با آن استفاده شده‌اند، چون تیمار یک کشت موفقیت‌آمیز نبوده یا منجر به گسترش یک میکروارگانیسم مقاوم به آنتی بیوتیک می‌شود. آلودگی‌زدایی فقط باید در شرایط اضطراری تحت شرایط قرنطینه و زیرنظر سرپرست با تجربه صورت پذیرد. در صورتی که آلودگی‌زدایی موفقیت‌آمیز نبود، باید کشت و معرف‌های همراه آن اتوکلاو شوند.

دستور کار۳-۱۱- ریشه‌کنی آلودگی میکروبی

طرح کلی

کشت را چندین مرتبه با شستشوی تک لایه یا با سانتریفوژ و تعلیق مجدد سلول‌های غیر چسبنده در یک غلظت بالای آنتی‌بیوتیک شستشو دهید. سپس کشت را برای سه واکشت با آنتی‌بیوتیک و سه واکشت بدون آنتی‌بیوتیک رشد دهید. بعد از هر واکشت آن را از لحاظ آلودگی بررسی کنید.

مواد:

استریل:

DBSS (BSS تشریح: Dissection BSS)

محیط کشت با غلظت بالای آنتی‌بیوتیک

مواد برای واکشت

غیر استریل:

میکروسکوپ، ترجیحاً با عدسی‌های ×۴۰ و ×۱۰۰ فاز کنتراست

مواد برای رنگ‌آمیزی میکوپلاسما

دستور کار:

۱- محیط کشت آلوده را با دقت جمع‌آوری کنید. در صورت امکان باید ارگانیسم از نظر حساسیت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی تست شود. در صورتی که ارگانیسم به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس نبود، محیط کشت را اتوکلاو کرده یا به آن هیپوکلریت اضافه کنید.

۲- سلول‌ها را با DBSS شستشو دهید (رقیق کردن می‌تواند تعداد آلوده کننده‌ها را کاهش دهد مگر اینکه به سلول‌ها چسبیده باشند).

a)برای کشت‌های تک لایه، کشت را سه مرتبه با DBSS شستشو داده، تریپسینه کرده و سپس سلول‌ها را دو مرتبه دیگر با سانتریفوژ و تعلیق مجدد در DBSS شستشو دهید.

b)برای کشت‌های سوسپانسیون، کشت را پنج مرتبه با سانتریفوژ و تعلیق مجدد در DBSS شستشو دهید.

۳- مجدداً در یک فلاسک جدید در پایین‌ترین دانسیته بذرافشانی قابل قبول، بذرافشانی کنید.

۴- محیط کشت دارای غلظت بالای آنتی‌بیوتیک را اضافه کرده و هر دو روز کشت را تعویض کنید.

۵- در یک محیط کشت دارای غلظت بالای آنتی‌بیوتیک واکشت دهید.

۶- مراحل ۴-۱ را برای سه واکشت تکرار کنید.

۷- آنتی‌بیوتیک‌ها را خارج کرده و سلول‌ها را برای سه واکشت دیگر بدون آنتی‌بیوتیک کشت دهید.

۸- کشت‌ها را با میکروسکوپ فازکنتراست و رنگ‌آمیزی Hoechst چک کنید.

۹- سلول ها را برای دو ماه دیگر بدون آنتی‌بیوتیک کشت داده و چک کنید تا مطمئن شوید که تمام آلودگی بر طرف شده است.

قانون کلی باید به این صورت باشد که کشت‌های آلوده دور ریخته شوند و برای رفع آلودگی تلاش نشود مگر این که حفظ سویه سلولی کاملاً حیاتی باشد. در هر صورت آلودگی زدایی کامل به خصوص در مورد مخمرها مشکل می‌باشد و تلاش برای رفع آلودگی ممکن است منجر به ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شود.

ریشه‌کنی میکوپلاسما

اگر در کشتی میکوپلاسما آشکار شد، همانند اشکال دیگر آلودگی اولین و مهم‌ترین قانون این است که کشت باید اتوکلاو یا خاکستر شود. در موارد استثنایی (مثلاً اگر رده آلوده شده غیرقابل جایگزین باشد)، ممکن است تلاش شود تا از کشت رفع آلودگی شود. رفع آلودگی فقط باید توسط فرد با تجربه انجام شود و کار باید تحت شرایط قرنطینه صورت پذیرد.

چندین ماده شامل کانامایسین، جنتامایسن، تیلوزین، پلی آنتول سولفونات (poly-anethol sulfonate) و ۵- برمو اوراسیل به همراه Hoechst 33258 و نورUV در برابر میکوپلاسما فعال می باشند. همچنین در بعضی موارد کشت توام با ماکروفاژها، پاساژهای حیوانی و آنتی‌بیوتیک‌های سیتوتوکسیک می تواند موثر باشد. هر چند تیلوزین، عامل حذف میکوپلاسما :Mycoplasma Removal Agent)

MRA) ، سیپروفلوکساسین و BM-Cycline موثرترین عوامل بوده است.

کشت‌های مشکوک باید همانند دستور کار ۳-۱۱ با استفاده از MRA، BM-cycline یا تیلوزین در غلظت توصیه شده توسط شرکت سازنده، به جای آنتی بیوتیک‌های معمول، در DBSS و محیط کشت تیمار شود. هر چند این عمل باید فقط در موارد ضروری و توسط افراد با تجربه و در شرایط ایزوله انجام شود. بنابراین به مراتب دور ریختن کشت‌ها امن‌تر می‌باشد.

ریشه‌کنی آلودگی ویروس

در حال حاضر هیچ روش قابل اعتمادی برای ریشه‌کن کردن ویروس‌ها از یک کشت وجود ندارد؛ از بین بردن یا چشم‌پوشی از آن تنها انتخاب‌ها می‌باشد.

آلودگی‌های مزمن

بسیاری از آزمایشگاه‌ها از دوره های آلودگی رنج برده که به نظر می‌رسد نسبت به تمام روش‌های درمانی متداول جواب نمی‌دهند. هیچ راه حل آسانی برای این مشکل وجود نداشته، به جز این که توصیه‌های قبلی به صورت کامل دنبال شده، توجه خاصی به تغییرات تکنیک، کارکنان جدید، شرکت‌های سازنده جدید، تجهیزات نو و نگهداری نامناسب هودهای لامینارفلو یا وسایل دیگر شود. به طور نمونه به نظر می‌رسد افزایش میزان آلودگی از نقص در تکنیک، افزایش اسپورها در فضا، نگهداری بد انکوباتوها، یک اتاق سرد یا یخچال آلوده یا یک نقص کوچک متناوب در یک آون یا اتوکلاو استریل کننده باشد.

همچنین استفاده دائم از آنتی بیوتیک‌ها به گسترش آلودگی مزمن کمک می‌کند. بسیاری از ارگانیسم‌ها توسط آنتی‌بیوتیک‌ها ممانعت شده اما کشته نمی‌شوند. بنابراین آنها در کشت به صورت غیرآشکار به مدت زمانی طولانی باقی مانده اما وقتی که شرایط تغییر یافته یا زمانی که نوسانات جمعیت میزبان ـ انگل وجود دارد، به صورت دوره ای ظاهر می شوند. لازم است که کشت ها حداقل در بعضی از مواقع و ترجیحاً در همه مواقع بدون آنتی بیوتیک نگهداری شوند، در غیر این صورت آلودگیهای نهانی پایدار شده، تشخیص منشاء آنها مشکل شده و برطرف سازی آنها غیرممکن خواهد شد.

یک تغییر جزئی در روش کار، ورود کارمند جدید، یا افزایش فعالیت به گونه‌ای که افراد بیشتری از یک وسیله استفاده کنند، می تواند همگی در افزایش دادن میزان آلودگی دخیل باشند. قوانین باید سخت و شدید باقی بمانند، حتی اگر دلایل آن همیشه برای کاربر مشخص نباشد و نباید تغییرات در روش‌های روتین به طور اتفاقی ایجاد شود. اگر روش‌های انحصاری نگهداشته شوند، ممکن است آلودگی به طور کامل حذف نشود اما در مراحل اولیه تشخیص داده خواهد شد.

آلودگی‌های متقاطع

در طی توسعه کشت بافت، تعدادی از سویه‌های سلولی با زمانهای دو برابر شدن کوتاه و راندمان پلیتینگ بالا ظاهر شده‌اند. هر چند این ویژگی‌ها، چنین رده‌های سلولی را به مواد تجربی با ارزشی تبدیل کرده است، اما همچنین آنها را به صورت بالقوه خطرناک برای آلودگی متقاطع رده‌های سلولی دیگر مبدل ساخته است. اکنون به طور واضح آلودگی متقاطع وسیع بسیاری از رده‌های سلولی با HeLa و دیگر رده‌های سلولی تند رشد، مشخص شده است، اما بسیاری از افراد هنوز از جدی بودن خطر ناآگاه می باشند.

روش‌های زیر به جلوگیری از آلودگی متقاطع کمک خواهد کرد:

۱)به دست آوردن رده های سلولی از یک بانک سلولی معتبر تا تعیین هویت مناسب سلولها انجام شده باشد و یا تعیین ویژگی‌های لازم، به محض این که امکان‌پذیر شد، توسط خود شما انجام پذیرد.

۲)بطری‌های محیط‌های کشت یا فلاسک‌های کشت را به طور همزمان برای بیش از یک رده سلولی استفاده نکنید.

۳)با رده های تند رشد از قبیل HeLa بعد از کشت‌های دیگر کار شود.

۴)هرگز از یک پی پت مشابه برای رده‌های سلولی مختلف استفاده نشود.

۵)هرگز از یک بطری مشابه محیط کشت، تریپسین و غیره برای رده‌های اصلی متفاوت استفاده نشود.

۶)پس از وارد کردن پی پت به یک فلاسک کشت حاوی سلولها، آن را به داخل بطری محیط کشت، تریپسین و غیره باز نگردانید.

۷)ابتدا محیط کشت و معرفهای دیگر را به فلاسک افزوده و سپس در انتها سلول‌ها را اضافه کنید.

۸)از پی پت بدون توپی (unplugged) یا سمپلرهای بدون سرپی‌پت‌های توپی‌دار برای نگهداری روتین استفاده نکنید.

۹)به طور منظم ویژگی‌ها کشت را چک کرده و به هرگونه تغییر ناگهانی در مورفولوژی، میزان رشد و غیره مشکوک شوید. حضور یا عدم حضور آلودگی متقاطع ممکن است با انگشت‌نگاری DNA (DNA Finger Printing)، کاریوتایپ یا آنالیزهای ایزوآنزیم تایید شود.

نتایج

کشت‌های زنده را از لحاظ آلودگی به طور منظم با میکروسکوپ معمولی و فازکنتراست و برای میکوپلاسما با به

کارگیری رنگ‌آمیزی فلورسنت برای نمونه های تثبیت شده چک کنید.

همه کشت‌ها را به طور روتین با آنتی‌بیوتیک‌ها نگهداری نکنید. حداقل یک سری از کشت‌های هر رده سلولی را برای حداقل دو هفته و ترجیحاً به طور پیوسته بدون آنتی‌بیوتیک رشد دهید تا به عفونت‌های نهانی امکان آشکار شدن داده شود.

برای آلودگی زدایی یک کشت تلاش نشود مگر این که غیرقابل جایگزین بوده و اینکار فقط تحت شرایط قرنطینه انجام پذیرد.

همه رده‌های جدید که وارد آزمایشگاه می‌شوند را تا زمانی که مطمئن شوید آلوده نیستند، در قرنطینه نگه‌داری کنید.

محیط‌های کشت یا محلول‌های دیگر را در بین رده‌های سلولی یا در میان افراد مختلف به اشتراک نگذاشته و ویژگی‌های رده سلولی را به طور متناوب چک کرده تا در برابر آلودگی متقاطع محافظت شوند.

رده‌های سلولی جدید باید بلافاصله پس از جداسازی ترجیحاً توسط انگشت نگاری DNA یا profiling تعیین هویت شوند.

فصل دوازدهم

منجمد نگهداری(cryopreservation)

از آنجائیکه نگهداری رده های سلولی در محیط کشت امکان پذیر نمی باشد و به دلیل اینکه در طی کشت ممکن است خواص سلولها تغییر یابد، ذخیره سازی سلولها در پاساژهای مختلف برای استفاده های بعدی کاملاً ضروری می باشد. واکشت متوالی سلولها، امری وقت گیر بوده و می تواند منجر به آلودگی یا رانش ژنتیکی(genetic drift) شود. قرار دادن سلولها در درجه حرارت های کرایوژنیک (cryogenic)، با متوقف کردن زمان، باعث پایداری آنها می شود. پایدارسازی سلولها در درجه حرارت های کرایوژنیک به نام منجمد نگهداری نامیده می شود. پیشرفت در تکنولوژی منجمد نگهداری منجر به ابداع روشهایی شده است که باعث نگهداری انواع سلولها در درجه حرارت پایین می شود. تکنیک هایی برای نگهداری میکروارگانیسم ها، سلولهای جدا شده از بافت، ارگانیسم های چند سلولی کوچک و حتی ارگانیسم های پیچیده تر مثل جنین ها موجود می باشد. فرایند منجمد کردن شامل پدیده های پیچیده ای بوده که حتی بعد از چند دهه تحقیق بطور کامل مشخص نشده است.

دلیل منجمد کردن سلولها

در کشت های پیوسته، رده های سلولی به دلیل گزینش در کشت پاساژ اولیه، پیری در رده های سلولی متناهی و ناپایداری ژنتیکی و فنوتیپی در رده های سلولی پیوسته در معرض تغییر می باشند. به علاوه حتی بهترین آزمایشگاهها هم در معرض نقص تجهیزات و آلودگی می باشند. همچنین آلودگی متقاطع وتشخیص غلط هم رخ می دهد.

دلایل متعددی برای منجمد کردن استوک سلولها وجود دارد که این دلایل را می توان به صورت زیر خلاصه نمود:

۱) رانش ژنوتیپی در نتیجه ناپایداری ژنتیکی
۲) پیرشدگی(senescence) و انقراض رده سلولی
۳) ترانسفورماسیون مشخصات رشد و اکتساب خصوصیات وابسته به بدخیمی
۴) ناپایداری فنوتیپی در نتیجه انتخاب و تمایز
۵) آلودگی با میکروارگانیسم ها
۶) آلودگی متقاطع با رده های سلولی دیگر
۷) تشخیص غلط به دلیل دستکاری بی دقت
۸) خرابی انکوباتور
۹) صرفه جویی در زمان و مواد برای نگهداری رده های سلولی
۱۰)نیاز به توزیع رده های سلولی در بین مصرف کنندگان دیگر

اکتساب سلولها برای منجمد نگهداری

قبل از این که رده سلولی برای منجمد نگهداری در نظر گرفته شود، شرایط خاص وجود دارد که باید به آن توجه کرد:

تأیید : باید قبل از منجمد نگهداری نشان داده شود که رده های سلولی فاقد آلودگی بوده و معتبر می باشند. هر چند که ممکن است قبل از این که تأیید کامل صورت پذیرد، تعداد کمی آمپول از یک رده سلولی جدید منجمد شوند، باید قبل از این که استوک های بزرگ منجمد شوند، تأیید صحیح صورت پذیرد.

زمان منجمد کردن: اگر رده سلولی متناهی می باشد، برای ایجاد تعداد کافی از سلولها برای منجمد کردن باید آن را حدود پنج دو برابر شدن جمعیت رشد داد. رده های سلولی پیوسته باید کلون شوند، یک سلول که تعیین ویژگی شده انتخاب شود و استوک های کافی برای منجمد کردن رشد داده شوند. رده های سلولی پیوسته دارای مزیت هایی می باشند: آنها به

صورت نامحدود زنده مانده، بسیار سریعتر رشد کرده و می توان آنها را به آسانی کلون کرد اما آنها از لحاظ ژنتیکی کمتر پایدار می باشند. رده های سلولی متناهی معمولاً دیپلوئید یا نزدیک به آن بوده و بین سطوح پاساژ مشخص پایدار می باشند اما کلون کردن آنها سخت تر بوده، بسیار آهسته تر رشد می کنند و در نهایت مرده یا ترانسفورم می شوند.

اصول منجمد نگهداری

زمینه تئوری منجمد کردن سلولها

منجمد کردن بهینه سلولها برای حداکثر بازیافت سلولهای زنده در هنگام ذوب کردن، وابسته به حداقل رساندن تشکیل کریستال یخ داخل سلولی و کاهش آسیب ناشی از سرما می باشد. این کار a) با منجمد کردن آهسته تا امکان خارج شدن آب از سلول را بدهد اما نه به آهستگی که زمینه افزایش کریستالهای یخ فراهم شود b) با استفاده از یک ماده محافظ در برابر انجماد آبدوست تا باعث جداشدن آب شود c) با ذخیره کردن سلولها در پایین ترین دمای ممکن تا اثرات غلظت های نمک بالا بر روی دناتوراسیون پروتئین در میسل های داخل یخ به حداقل برسد و d) با ذوب سریع تا تشکیل کریستال یخ و ایجاد اختلاف غلظت مواد حل شده که به دلیل ذوب یخ داخل سلولی باقیمانده تشکیل می شود را به حداقل برساند.

آب جزء اصلی همه سلولهای زنده بوده و برای انجام فرایندهای شیمیایی باید در دسترس سلول باشد. وقتی که تمام آب در سیستم به یخ تبدیل می شود، متابولیسم سلولی متوقف می شود. در طی سرد کردن آهسته سلولها، قبل از اینکه درون سلول تولید یخ شود، در خارج سلول کریستالهای یخ تشکیل می شود. به محض تشکیل یخ در خارج سلول، آب از محیط خارج سلولی خارج شده و باعث غیر متعادل شدن فشار اسمزی در غشاء سلولی شده که منجر به خارج شدن آب از سلول می شود. میزان سرد کردن(cooling rate) اثر قابل ملاحظه ای برروی این پدیده ها دارد. سرد کردن سریع، اثرات غلظت جسم حل شده (solute effect) را به حداقل می رساند، بطوریکه باعث می شود یخ به صورت یکنواخت تشکیل شود اما باعث ایجاد مقدار بیشتری یخ داخل سلولی می شود. سرد کردن آهسته باعث کمبود بیشتر آب برای سلول و میزان کمتری یخ درون سلولی می شود اما تأثیرات محلول (solution effects) را تشدید می کند. نفوذپذیری سلولی برروی میزان از دست رفتن آب سلولی موثر است. سلولهایی که بیشتر نفوذپذیر هستند بهتر از سلولهایی که نفوذپذیری کمتری دارند قادر به تحمل سرد کردن سریع می باشند. Mazur و همکاران پیشنهاد کرده اند که تشکیل کریستالهای یخ و تأثیرات محلول هر دو یک نقش را در غیر فعالسازی سلولها بر عهده دارند و یک مقدار سردکنندگی بهینه، تأثیرات هر یک را به حداقل می رساند. به جزء چند مورد استثناء، مقدار سردکنندگی 1° C در هر دقیقه ترجیح داده می شود. همچنین با استفاده از افزودنیها و یا مواد شیمیایی محافظت کننده در برابر انجماد که سلولها را در طی منجمد شدن حفاظت می کنند، می توان تأثیرات زیان آور افزایش غلظت جسم حل شده و تشکیل کریستال یخ را به حداقل رساند. پرمصرف ترین عوامل محافظت کننده در برابر انجماد، دی متیل سولفوکساید (DMSO)و گلیسرول می باشد. به علاوه نگهداری سلولهای منجمد شده در درجه حرارت ذخیره سازی مناسب و استفاده از یک مقدار گرم کنندگی مناسب، آسیب به سلولهای منجمد را به حداقل می رساند.

غلظت سلولی

به نظر می رسد وقتی که سلولها در غلظت سلولی بالا منجمد می شوند در هنگام منجمد شدن بهتر زنده می مانند. این امر عمدتاً یک مشاهده تجربی می باشد اما احتمالاً تا حدودی مربوط به این است که کاهش زیستایی در هنگام ذوب کردن نیازمند یک غلظت بذرافشانی بالاتر بوده و در یک غلظت سلولی بالا چنانچه سلولها به دلیل آسیب ناشی از سرما سوراخ دار باشند تا حدودی برای بهبود بقاء می باشد. همچنین غلظت بالاتر در هنگام منجمد کردن امکان رقیق کردن کافی ماده محافظت کننده در برابر انجماد را در هنگام بذرافشانی مجدد بعد از ذوب کردن می دهد به طوریکه به سانتریفوژکردن نیازی نمی باشد (حداقل برای اکثر سلولها). تعداد سلولهای منجمد شده باید به اندازه ای بوده که امکان رقیق کردن به نسبت ۱:۱۰ یا۱:۲۰ در هنگام ذوب کردن برای رقیق کردن ماده محافظ در برابر انجماد وجود داشته اما باز هم غلظت سلولی بالاتر از پاساژ طبیعی باقی بماند؛ به عنوان مثال برای سلولهایی که در شرایط عادی در غلظت cells/mL $۱×۱۰^{۵}$ واکشت داده می شوند باید $۱×۱۰^{۷}$ سلول در ۱ mL محیط کشت منجمد شود و بعد از ذوب کردن سلولها، کل ۱ mL باید با محیط کشت به حجم ۲۰ mL رسانده شود تا غلظت cells/mL $۵×۱۰^{۵}$ حاصل شود(پنج برابر غلظت بذرافشانی طبیعی). این کار ماده محافظت کننده در برابر انجماد را از ٪۱۰ به ٪۰/۵ رقیق کرده که در این غلظت احتمال سمی بودن کمتر می باشد. ماده محافظت کننده در برابر انجماد باقیمانده ممکن است به محض این که سلولها شروع به رشد می کنند(برای کشت های سوسپانسیون) یا وقتی که سلولها متصل می شوند و محیط کشت تعویض می شود(برای کشت های تک لایه) رقیق شود.

محیط کشت انجماد

سوسپانسیون سلولی در حضور یک ماده محافظ در برابر انجماد از قبیل گلیسرول یا دی متیل سولفوکساید(DMSO) منجمد می شود. از این دو ماده به نظر می رسد DMSO مؤثرتر باشد که احتمالاً به این دلیل می باشد که بهتر از گلیسرول به سلول نفوذ می کند. غلظت های بین ٪۵ و ٪۱۵ استفاده می شود اما غلظت ٪۷/۵ یا ٪۱۰ متداول تر می باشد. در مورد بعضی از سلولها مثل سلولهای خونساز از قبیل L5178Y یا HL60 ممکن است DMSO سمی بوده یا باعث القاء سلولها به تمایز شود در این گونه موارد ترجیح داده می شود یا از گلیسرول استفاده شود یا سلولها را بعد از ذوب کردن سانتریفوژ کرد تا ماده محافظت کننده در برابر انجماد رقیق شود.

قبلاً گفته می شد که سلولها بعد از افزودنDMSO به محیط کشت انجماد و قبل از منجمد کردن باید در دمای ۴°C نگهداری شوند اما مطالعات اولیه نشان می دهد که این کار بقاء را بعد از منجمد کردن افزایش نمی دهد و حتی ممکن است آن را کاهش دهد که شاید به دلیل ممانعت از نفوذ داخل سلولی باشد. هر چند این موضوع هنوز به طور کامل حل نشده و نیازمند آزمایشات بیشتر می باشد.

DMSO باید بی رنگ بوده و در شیشه یا پلی پروپیلن نگهداری شود زیرا حلال قوی بوده و ناخالصی های لاستیک و بعضی از پلاستیک ها را در خود حل می کند. گلیسرول نباید بیش از یک سال مانده باشد زیرا ممکن است بعد از ذخیره طولانی مدت سمی شود. گلیسرول و DMSO باید از گرید معرف(reagent grade) یا گرید بهتر بوده، و قبل از استفاده استریل شوند. گلیسرول را می توان با اتوکلاو کردن و DMSO را با استفاده از یک فیلتر سر سرنگی نایلون ۰/۲μm یا یک فیلتر سرسرنگی تفلونPTFE که قبلاً با الکل شستشو و با DMSO آب کشی شده استریل کرد. عوامل محافظت کننده در برابرانجماد را باید در حجم های مورد نیاز برای یک بار مصرف تهیه کرد تا با مصرف مکرر از یک ظرف، خطر آلودگی و وارد شدن رطوبت به آنها به حداقل برسد. در هنگام کار با DMSO باید مراقبت کامل صورت گیرد زیرا به سرعت از طریق پوست جذب شده و ممکن است مواد مضر را به همراه خود به بدن انتقال دهد.

مواد محافظت کننده در برابر انجماد دیگری هم از قبیل پلی وینیل پیرولیدون (polyvinylpyrrolidone : PVP) ، پلی اتیلن گلیکول(PEG) و هیدروکسی اتیل نشاسته (hydroxyethyl starch : HES) وجود دارند اما هیچ کدام مقبولیت عمومی DMSO یا گلیسرول را ندارند، هر چند در مورد تری هالوز پیشرفت هایی وجود دارد. همچنین بسیاری از آزمایشگاهها غلظت سرم در محیط کشت انجماد را تا ٪۴۰ ، ٪۵۰ یا حتی ٪۱۰۰ افزایش می دهند.

تعادل

دوره زمانی بین مخلوط کردن عامل محافظت کننده در برابر انجماد با سوسپانسیون سلولی و شروع فرایند سرد کردن دوره تعادل(equilibration period) نامیده می شود. برای اکثر سلولها این زمان تعادل باید حداقل ۱۵ دقیقه و حداکثر ۶۰- ۴۵ دقیقه باشد. زمان تعادل خیلی طولانی، ممکن است برای سلولها سمی باشد. تعادل که باید در درجه حرارت محیط صورت پذیرد، زمان لازم برای نفوذ عامل محافظت کننده در برابر انجماد را فراهم می سازد. سلولهای بزرگتر و دارای نفوذپذیری کمتر به زمان تعادل طولانی تری نیاز دارند. در طی این دوره زمانی می توان سوسپانسیون سلولی را در ویالها توزیع کرد. زمان تعادل بهینه باید به صورت تجربی تعیین شود تا بازیافت بعدی سلولها را به حداکثر برساند.

میزان سرد کردن

اغلب سلولهای کشت یافته اگر به میزان ۱°C در هر دقیقه سرد شوند بهتر زنده می مانند. این امر احتمالاً به این دلیل می باشد که منجمد کردن سریع، رشد کریستال یخ را به حداقل می رساند و سرد کردن آهسته مهاجرت آب به خارج سلول را تسهیل می کند. شکل منحنی سرد کردن توسط a) درجه حرارت محیط اطراف b) هرگونه عایق در اطراف سلولها به انضمام آمپول c)گرمای ویژه و حجم محتویات آمپول و d) جذب گرمای نهفته در طی منجمد کردن مشخص می شود. وقتی سلولها در یک ظرف عایق در یک فریزر با درجه حرارت پایین همانند مراحل ۴-۱ در زیر منجمد می شوند تشکیل یک منحنی را می دهند با یک میزان سردکنندگی سریع در شروع وقتی که دیفرانسیل حرارتی بیشترین مقدار است، سپس یک حداقل در نقطه eutectic، یک افزایش ناچیز هنگام آغاز انجماد و به دنبال آن یک مرحله سکون هنگامی که گرمای نهانی انجماد جذب می شود و سپس یک کاهش سریعتر تا هنگامی که انجماد کامل می شود و به تدریج کاهش آن تا هنگامی که به درجه حرارت محفظه انجماد می رسد.

وقتی سلولها به فریزر نیتروژن مایع منتقل شدند (یا در یک فریزر قابل برنامه ریزی به مرحله آخر می رسند) درجه حرارت سریعاً بین-۱۸۰°C و -۱۹۶° C کاهش می یابد.

یک میزان سردکنندگی کنترل شده را به چند طریق می توان ایجاد کرد :

۱) آمپول ها را روی لایی پنبه (cotton wool) در یک جعبه فوم پلی استیرن با ضخامت دیواره حدود ۱۵ mm قرار دهید. این جعبه به همراه لایی پنبه باید عایق بندی لازم را فراهم کرده به صورتی که وقتی جعبه در دمای -۷۰ °C یا -۹۰ °C در یک فریزر یا ظرف عایق حاوی CO_2 جامد

قرار داده شود آمپول ها به میزان ^oC ۱ در هر دقیقه سرد خواهند شد.

۲) کن ها را در لوله عایق فومی با ضخامت حدود ۱۵mm قرار داده و آن را در دمای ^oC ۷۰ – یا ^oC ۹۰– در یک فریزر یا یک ظرف عایق حاوی CO_2 جامد قرار دهید.

۳) آمپول ها را در یک فریزر Taylor Wharton قرار دهید و آن را در دهانه یک فریزر نیتروژن جایگزین کنید.

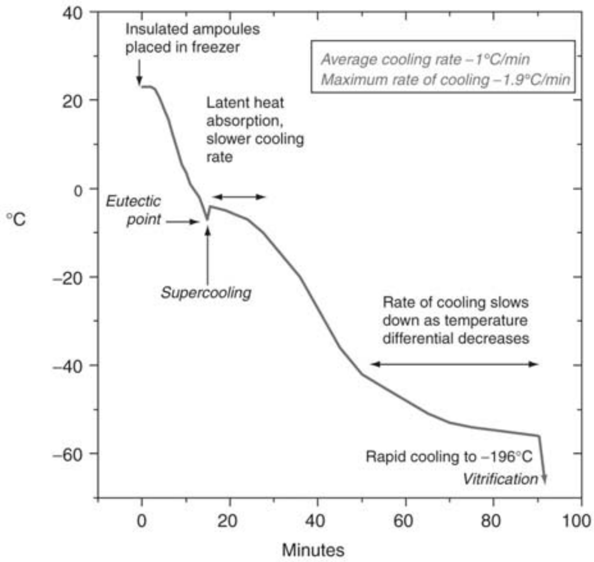
۴) آمپول ها را در یک ظرف انجماد Nalge Nunc قرار داده و آن را در دمای ^oC ۷۰ – یا ^oC ۸۰ – قرار دهید.

۵) از یک فریزر قابل برنامه ریزی که به میزان^oC ۱ در هر دقیقه برنامه ریزی شده استفاده کنید.

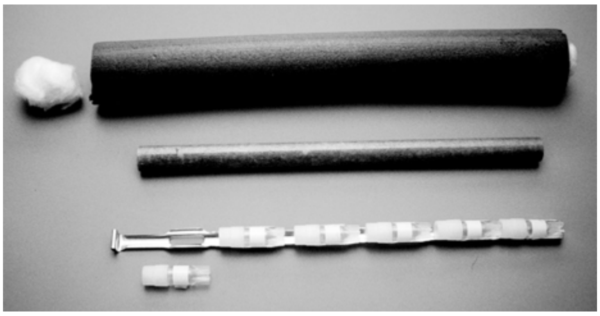
با هر یک از چهار روش اول مثل روش لوله عایق در روش ۲، میزان سردکنندگی یک میانگین از مقادیر متفاوت در کل منحنی بوده و هیچ تلاشی برای کنترل سردکنندگی زیاد در نقطه eutectic یا در مدت مرحله سکون در طی جذب گرمای نهانی انجام نمی شود که هر دو آنها ممکن است به بقاء آسیب برسانند. اگر بازیافت پایین باشد، امکان تغییر میزان سردکنندگی متوسط وجود دارد (یعنی با استفاده از عایق بندی کمتر یا بیشتر). استفاده از یک فریزر قابل برنامه ریزی دارای یک کاوشگر (probe) که درجه حرارت آمپول را حس کرده و میزان کافی از نیتروژن مایع به محفظه اضافه کرده تا یک میزان سردکنندگی از قبل برنامه ریزی شده را فراهم سازد، استرس سرمای بیش از حد را به حداقل رسانده و یک میزان سردکنندگی خطی را در کل مراحل فراهم می سازد. مقادیر سردکنندگی مختلف در فازهای مختلف منحنی سرد کردن به صورت تجربی بهینه شده تا مناسب سلولهایی باشد که قرار است منجمد شوند تا بتواند مطابق منحنی سردکنندگی برنامه ریزی شود. هر چند سردکننده های قابل برنامه ریزی در مقایسه با وسایل ساده ای که در مراحل ۴-۱ بالا شرح داده شده نسبتاً گران بوده و دارای مزیت های کمی بوده مگر این که شما قادرید میزان سردکنندگی را تغییر داده یا شکل منحنی سردکنندگی را عوض کنید.

در مورد روش هایی که از ظروف عایق بندی استفاده می کنند، میزان سردکنندگی متناسب با تفاوت درجه حرارت بین آمپول ها و هوای محیط اطراف می باشد. اگر آمپول ها در یک فریزر در دمای^oC ۷۰ – قرار داده شوند، آنها سریعاً تا دمای حدود ^oC ۵۰ – سرد می شوند اما بعد از آن میزان سرد شدن به میزان زیادی کاهش می یابد. بنابراین زمانی که آمپول ها در فریزر^oC ۷۰– طی می کنند، باید بیشتر از میزان زمان پیشنهادی برای میزان سردکنندگی ^oC ۱ در هر دقیقه باشد، زیرا انتهای منحنی مجانب (asymptotic) می باشد. بهتر است که آمپول ها را قبل از انتقال به نیتروژن مایع به مدت یک شب در دمای^oC ۷۰ – قرار دهید. به علاوه وقتی که آنها را از فریزر خارج می کنید آنها به میزان حدود ^oC ۱۰ در دقیقه گرم خواهند شد. ضروری است که آنها بیش از ^oC ۵۰ – گرم نشوند، چرا که باعث زوال آنها می شود، بنابراین باید انتقال به فریزر نیتروژن مایع در کمتر از دو دقیقه صورت گیرد.

حلقه "O" برای تنظیم ارتفاع آمپول ها در داخل دهانه فریزر استفاده می شود. هر چه قدر ارتفاع کمتر شود میزان سرد شدن سریعتر می شود.



شکل ۱-۱۲: منحنی انجماد. ثبت کاهش درجه حرارت در یک آمپول حاوی محیط کشت که به همراه پنج آمپول دیگر در یک کن آلومینیومی قرار گرفته و در یک لوله مقوایی نازک احاطه شده و در داخل یک لوله فوم پلی اوره قرار گرفته(به شکل ۲-۱۲ رجوع شود) و در داخل یک فریزر $^\circ C$۷۰- گذاشته شده است.



شکل ۲-۱۲: آمپول ها در داخل کن. آمپول های پلاستیکی در داخل یک کن آلومینیومی (پایین) گذاشته شده، در یک لوله مقوایی نازک (وسط) احاطه شده و در داخل یک لوله فوم عایق(بالا) قرار داده شده اند. لوله عایق در سمت دیگر با پنبه یا مواد عایق مناسب دیگر مسدود شده است.

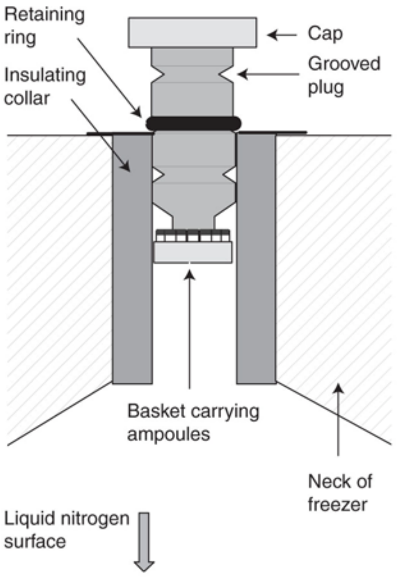
کرایو فریزرها از لحاظ اندازه دهانه، سیستم ذخیره سازی و موقعیت نیتروژن مایع متفاوت می باشند.

اندازه دهانه: سیستم ذخیره سازی در کانیستر(canister) گرایش به داشتن دهانه باریک دارد که در آن میزان تبخیر نیتروژن مایع کاهش می یابد اما دسترسی را کمی محدود می سازد. فریزرهای دهانه گشاد به دلیل سهولت دسترسی و حداکثر ظرفیت معمولاً با ذخیره سازی در قسمت هایی در داخل کشوها انتخاب می شوند اما دارای میزان تبخیر بیشتری می باشند. هر چند امکان انتخاب یک فریزر با دهانه نسبتاً باریک که در آن از سیستم سینی برای ذخیره سازی استفاده شود، وجود دارد.

سیستم ذخیره سازی: دو نوع اصلی مخزن برای آمپول های ۱ mL برای کار کشت سلولی وجود دارد. در سیستم کن (cane) آمپول ها در یک کن آلومینیومی قرار گرفته و در یک لوله مقوایی گذاشته شده و در داخل کانیسترهای استوانه ای در فریزر قرار می گیرند. مزیت این روش این است که در یک زمان می توان به شش آمپول بر روی یک کن از یک رده سلولی مشابه دسترسی داشت که انتقال از وسیله سردکننده به فریزر را راحت تر و سریع تر می سازد. کن ها را می توان رنگ کرد و شماره گذاری نمود تا یافتن آنها آسانتر شود و می توان بدون این که تمام آمپول ها در معرض هوای گرم قرار گیرند آمپول ها را خارج کرد. ذخیره سازی در کشوهای چهار گوش توسط بعضی افراد ترجیح داده می شود زیرا احساس می کنند که بازیابی آنها آسانتر است و آمپول ها را می توان با شماره کشو تشخیص داده و با کشو هماهنگ کرد.

هر چند که در زمان بازیابی یک آمپول، کل محتویات یک کشو که می تواند ۲۰ تا ۱۰۰ آمپول باشد در معرض محیط قرار گرفته و اگر شما بخواهید به یکی از کشوهای پایینی دسترسی داشته باشید لازم است که کل بسته را بلند کنید. هم چنین قرار دادن تعداد زیادی آمپول در یک کشو باید یکی یکی انجام شود که خطر تأخیر و افزایش زیاد درجه حرارت را به همراه دارد.

آمپول ها: آمپول های پلاستیکی برای مقاصد آزمایشی و آموزشی ترجیح داده می شوند زیرا کار با آنها ایمن تر و راحت تر می باشد اما بعضی از مخازن و بانک های سلولی آمپول های شیشه ای را برای استوک های بذر ترجیح می دهند زیرا ذخیره سازی دراز مدت در آن به خوبی به اثبات رسیده است و وقتی که این کار صحیح انجام شود، مهر وموم شدن آن قطعی است. آمپول های پلاستیکی معمولاً پلی پروپیلن بوده و رایج ترین اندازه آن ۱/۲mL می باشد. می توان با یک ماژیک دارای سر نازک بر روی آنها علامت زد که این ماژیک باید مقاوم به الکل بوده و قادر به مقاومت در برابر حرارت پایین



شکل۳-۱۲: دستگاه خنک کننده که در دهانه فریزر نصب می شود(neck plug cooler). این دستگاه خنک کننده مخصوص فریزرهای با دهانه تنگ، امکان کنترل درجه حرارت در مقادیر مختلف را فراهم می سازد(Taylor Wharton).

شکل ۴-۱۲: دستگاه خنک کننده Nalge Nunc. نگهدارنده پلاستیکی با پایه ای که توسط مایع پر می شود. گرمای ویژه مایع سرد کننده در داخل پایه، ظرف را عایق کرده و در آمپول ها یک میزان سرد کنندگی حدود $1^{\circ}C/min$ ایجاد می کند.

کرایو فریزر(cryofreezer)

در حال حاضر ذخیره سازی در فریزر نیتروژن مایع رضایت بخش ترین روش نگهداری سلولهای کشت داده شده می باشد. سلولهای منجمد شده وقتی که در دمای $-70\ ^{o}C$ یا کمتر هستند سریعاً به کرایو فریزر منتقل می شوند.

فریزر باشد. برچسب باید نشان دهنده اسم سویه سلولی و ترجیحاً تاریخ و حروف اول نام و نام خانوادگی فرد باشد، هر چند مورد آخر همیشه در فضای موجود امکان پذیر نمی باشد. همچنین درپوش های دارای رنگ های مختلف به تشخیص کمک می کند. به خاطر داشته باشید که کشت های سلولی ذخیره شده در نیتروژن مایع ممکن است بیش از شما زنده بمانند! بنابراین باید مدارک به وجود آمده به آسانی توسط افراد دیگر تفسیر شده و باید به اندازه کافی جامع بوده زیرا ممکن است سلولها توسط افراد دیگر استفاده شوند.

نکته ایمنی) افراد مبتدی باید از استفاده از آمپول های شیشه ای اجتناب کنند زیرا در هنگام ذوب کردن امکان انفجار آنها وجود دارد. در صورت استفاده از آمپول های شیشه ای، باید آنها را سریع و به طور کامل با یک شعله گاز – اکسیژن مهر و موم کرد. اگر مهر وموم کردن زیاد به طول انجامد، سلولها گرم شده و می میرند و هوای داخل آمپول منبسط شده و یک حفره در بالای آمپول ایجاد می شود. اگر آمپول کاملاً مهر و موم نشود ممکن است در طی ذخیره سازی در فاز مایع فریزر نیتروژن، نیتروژن مایع وارد آمپول شود و در هنگام ذوب کردن شدیداً منفجر شود.

برای نشت یابی، آمپول ها را قبل از منجمد کردن در یک دیش حاوی ٪۱ متیلن بلو(methylene blue) در الکل ٪۷۰ در دمای ^{o}C ۴ به مدت ۱۰ دقیقه قرار دهید. اگر آمپول ها درست مهر وموم نشده باشند، متیلن بلو به درون آمپول ها کشیده شده و باید آمپول را دور انداخت.

موقعیت نیتروژن مایع: اگر نیتروژن مایع در بدنه اصلی فریزر قرار گرفته باشد امکان پر کردن فریزر و غوطه ورکردن آمپول ها یا فقط نیمه پرکردن آن و نگهداری آمپول ها در فاز گازی وجود دارد. ذخیره سازی در فاز مایع به این معنی است که محفظه را می توان پرکرد و نیتروژن مایع مدت زمان طولانی تری دوام دارد اما خطر جذب نیتروژن توسط آمپول هایی که دارای نشتی هستند وجود دارد و بنابراین در هنگام ذوب کردن شدیداً منفجر می شوند. همچنین احتمال انتقال آلودگی بین آمپول ها بیشتر وجود دارد. با ورود عایق کاری پیشرفته و کاهش میزان تبخیر، شاید ذخیره سازی در فاز گازی ترجیح داده شود. هرچند از سطح نیتروژن مایع تا دهانه، یک شیب درجه حرارت حدود ^{o} C ۸۰ از ^{o}C ۱۹۰- تا حدود ^{o}C ۱۱۰ – در فاز گازی وجود دارد، هرچند طراحی و آرایش سیستم رک ها ممکن است در حذف این شیب کمک کند.

در بعضی از فریزرها، نیتروژن مایع در داخل دیوار فریزر قرار گرفته و در قسمت ذخیره سازی نمی باشد. این فریزرها توسط یک سیستم خودکار با کنترل های سطوح بالا و پایین مجدداً پرشده و نیتروژن تبخیر شده از طریق یک دریچه آزاد می شود. این روش دارای این مزیت می باشد که ذخیره سازی در فاز گازی صورت گرفته، مصرف نیتروژن مایع کمتر بوده و شیب حرارتی رفع می شود. هرچند سطح نیتروژن قابل رؤیت نبوده و نمی توان آن را با میله عمق سنج اندازه گیری کرد، بنابراین باید به سیستم الکترونیکی اعتماد کامل کرد. به علاوه رفع هرگونه انسداد جریان نیتروژن در داخل دیواره فریزر بسیار مشکل و یا حتی غیر ممکن می باشد، بنابراین ضروری است که نیتروژن مایع صاف شده و اطمینان حاصل شود که هیچ گونه آب یا بخار آب به سیستم وارد نمی شود زیرا یخ هم می تواند باعث مسدود شدن جریان نیتروژن شود.

نکته ایمنی) مواد دارای مخاطره زیستی باید در فاز گازی ذخیره شوند و باید آموزش لازم در مورد ذخیره سازی در فاز گازی داده شود. مخصوصاً اگر ذخیره سازی در فاز مایع باشد، باید استفاده کننده از خطر انفجار شیشه و پلاستیک آگاه شده و باید از یک حفاظ صورت یا عینک ایمنی استفاده کند.

بررسی و پر کردن مجدد نیتروژن مایع: سرمایه گذاری در محتویات یک فریزر نیتروژن مایع می تواند قابل توجه باشد و باید با رژیم بازبینی دقیق و هشدار دهنده ها ی الکترونیکی سطح مایع از آن محافظت کرد. وقتی که نیتروژن در قسمت ذخیره سازی می باشد، سطح نیتروژن باید حداقل هفته ای یکبار با میله عمق سنج(dipstick) اندازه گیری شده و در جدول یادداشت شود. حتی در صورت استفاده از پرکننده خودکار، اندازه گیری با میله عمق سنج باید انجام شود زیرا امکان خطای این سیستم ها وجود دارد.

در صورتی که مخزن نیتروژن مایع موجود نباشد، سلولها را می توان در یک فریزر معمولی نگهداری کرد. درجه حرارت این فریزر باید تا حد امکان پایین باشد. در دمای ^{o}C ۱۹۶ – زوال کمی یافت شده است اما در دمای ^{o}C ۷۰ – ممکن است زوال زیادی(٪۱۰–۵ در سال) صورت پذیرد.

دستور کار۱-۱۲- منجمد کردن سلول ها

طرح کلی

سلولها را تا انتهای فاز لگاریتمی (late log) رشد داده، یک سوسپانسیون سلولی با غلظت بالا در محیط کشت دارای ماده محافظت کننده در برابر انجماد تهیه کرده، درون آمپول ها توزیع کرده و آهسته منجمد کنید.

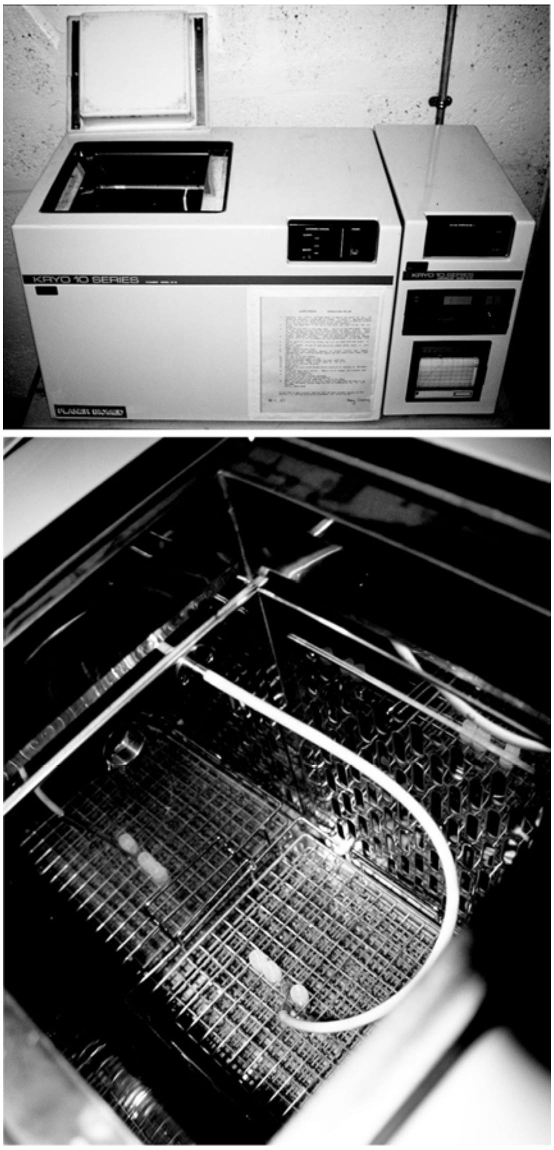
مواد

استریل یا تهیه شده در شرایط آسپتیک:

کشت سلولی که قرار است منجمد شود

برای کشت تک لایه : PBSA و تریپسین خام ٪۰/۲۵

محیط کشت رشد (سرم، بقاء سلولها را بعد از منجمد کردن افزایش می دهد؛ تا ٪۵۰ یا حتی سرم خالص استفاده می شود.



شکل ۵-۱۲: فریزر قابل برنامه ریزی. آمپول ها در یک محفظه عایق بندی شده قرار گرفته و میزان سرد کنندگی با تزریق نیتروژن مایع در داخل محفظه به میزانی که توسط یک حسگر بر روی رک دارای آمپول مشخص می شود و یک برنامه از پیش تنظیم شده در واحد کنسول تنظیم می شود.

در صورتی که با کشت های فاقد سرم، سرم استفاده شده باشد، باید بعد از ذوب کردن آن را شست و شو داد)

ماده محافظت کننده در برابر انجماد فاقد ناخالصی: DMSO در ویال شیشه ای یا پلی پروپیلن و یا گلیسرول تازه در ظرف یونیورسال

سرنگ ۱-۵ mL برای توزیع گلیسرول(زیرا لزج می باشد)

آمپول های پلاستیکی ۱/۲mL ، که نام رده سلولی و تاریخ منجمد کردن بر روی آن نوشته شده است

غیر استریل:

هموسیتومتر یا دستگاه شمارشگر سلولی الکترونیکی

کن یارک برای ذخیره سازی

ظرف عایق برای منجمد کردن : جعبه پلی استیرن دارای آستر پنبه ای یا لوله عایق

فوم پلاستیک

دستکش های حفاظتی نیتریل

دستور کار

۱- مطمئن شوید که کشت معیارهای لازم برای منجمد کردن را دارد و با چشم و میکروسکوپ مواد زیر چک شود :

a) ظاهر سالم

b) خصوصیات مورفولوژیکی

c) مرحله چرخه رشد(باید مراحل آخر فاز لگاریتمی قبل از وارد شدن به فاز سکون باشد)

d) فاقد آلودگی

۲- کشت را تا انتهای مرحله لگاریتمی رشد داده و در صورتی که از کشت تک لایه استفاده می کنید، سلولها را تریپسینه کرده و شمارش نمایید. در صورت استفاده از کشت سوسپانسیون، سلولها را شمرده و سانتریفوژ کنید.

۳- سلولها را باغلظت 2×10^{6}–2×10^{7} cells/mL به حالت شناور در آورید.

۴- یکی از مواد محافظت کننده در برابر انجماد را در محیط کشت رشد رقیق کرده تا محیط انجماد ساخته شود.

a) DMSO را به میزان ٪ ۲۰-۱۰ اضافه کنید.

نکته ایمنی) DMSO قادر است به بسیاری از غشاهای طبیعی و مصنوعی از قبیل پوست و دستکش های لاستیکی نفوذ کند. در نتیجه هرگونه مواد مضر مورد استفاده(مثل مواد سرطان زا) ممکن است از طریق پوست یا حتی دستکش های لاستیکی نفوذ کند. همیشه خصوصاً در حضور مواد سمی باید با احتیاط با DMSO کار شود.

یا

b) گلیسرول را به میزان ٪۳۰-۲۰ اضافه کنید.

۵- سوسپانسیون سلولی را با محیط کشت انجماد به نسبت ۱:۱ رقیق کرده تا حدود 1×10^{6}–1×10^{7} cells/mL و ٪۱۰-۵ DMSO (یا ٪۱۵-۱۰ گلیسرول) به دست آید. توصیه نمی شود که برای به حداقل رساندن زوال سلولها، آمپول ها بر روی یخ قرار داده شوند. یک تأخیر تا ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق وقتی کهDMSO استفاده می شود مضر نبوده و وقتی که گلیسرول استفاده می شود مفید می باشد.

شکل ۶-۱۲: فریزرهای نیتروژن مایع. (a) فریزر با دهانه باریک با ذخیره سازی روی کن ها در داخل کانیستر. (b) داخل فریزر دارای دهانه باریک. (c) فریزر دهانه گشاد با ذخیره سازی در کشوهای چهار گوش. (e) فریزر با ظرفیت بالا. (f) فریزرهای با ظرفیت بالا در یک بانک سلولی.

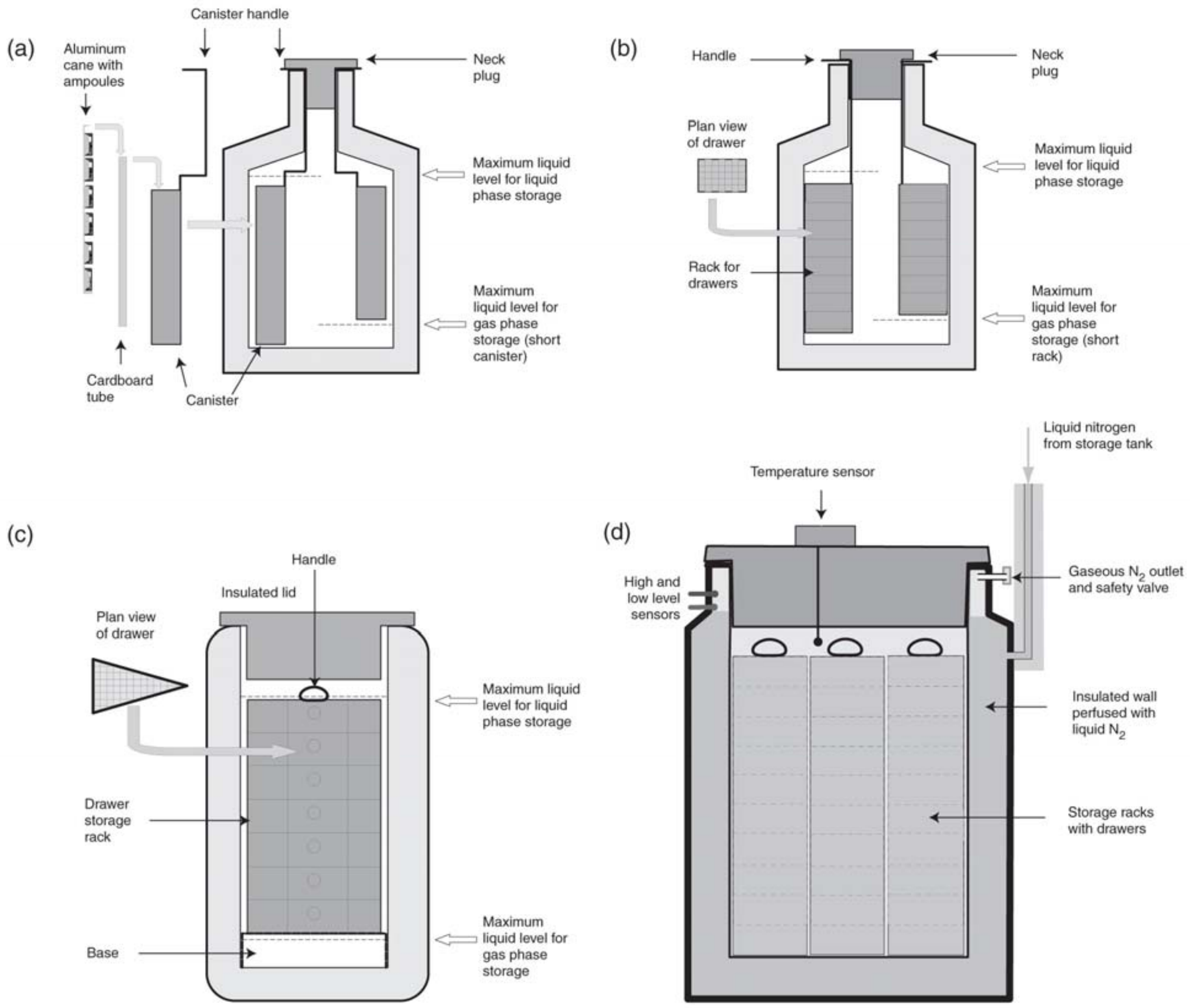
۶- سوسپانسیون سلولی را در داخل آمپول هایی که قبلاً دارای برچسب شده اند توزیع کرده و درپوش آمپول ها را بدون این که واشر آنها خراب شود محکم ببندید.

۷- آمپول ها را برای ذخیره در کانیستر در داخل رک ها قرار دهید یا آنها را برای ذخیره در کشوها به همان حال باقی گذارید.

۸- آمپول ها را با یکی از روش هایی که در بالا شرح داده شده است به میزان $^{o}C/\ min$ ۱ منجمد کنید. با روش های ظروف عایق، پس از قرار دادن آنها در دمای ^{o}C ۷۰- در صورتی که دمای محیط اطراف ^{o}C ۲۰ باشد، حداقل ۶-۴ ساعت طول خواهد کشید، اما ترجیحاً آمپول ها را در ظرف در دمای ^{o}C ۷۰- به مدت یک شب قرار دهید.

۹- وقتی که آمپول ها به دمای ^{o}C ۷۰- یا پایین تر رسیدند قبل از خارج کردن آمپول ها از فریزر ^{o}C ۷۰- یا فریزر با دمای کنترل شده، رکورد فریزر را چک کنید و یک مکان مناسب را برای آمپول ها تعیین کنید.

۱۰- آمپول ها را به فریزر نیتروژن مایع انتقال داده، ترجیحاً در مایع غوطه ور نکنید، کن و لوله را در کانیستری که از قبل مشخص شده یا آمپول ها را در جای مناسب در کشوی از قبل تعیین شده قرار دهید. این انتقال باید سریع انجام شود



شکل ۷-۱۲: طرح فریزر نیتروژن. چهار نوع عمده فریزرهای نیتروژن: (a) دهانه باریک که آمپول ها در روی کن ها در داخل کانیستر قرار دارند (ظرفیت بالا و میزان تبخیر اندک). (b) دهانه باریک که آمپول ها در رک های چهار گوش قرار دارند (ظرفیت متوسط و میزان تبخیر اندک). (c) دهانه گشاد که آمپول ها در رک های سه گوش قرار دارند (ظرفیت بالا و میزان تبخیر بالا). (d) دهانه گشاد که آمپول ها در کشوها ذخیره شده اند و نیتروژن مایع از طریق یک لوله به فریزر تزریق شده و سطح نیتروژن به صورت خود کار توسط حسگرها کنترل می شود.

(کمتر از ۲ دقیقه) زیرا آمپول ها به میزان حدود ۱۰ ^{o}C در دقیقه گرم خواهند شد و اگر درجه حرارت بالاتر از ۵۰- ^{o}C برسد سلولها سریعاً دچار زوال خواهند شد.

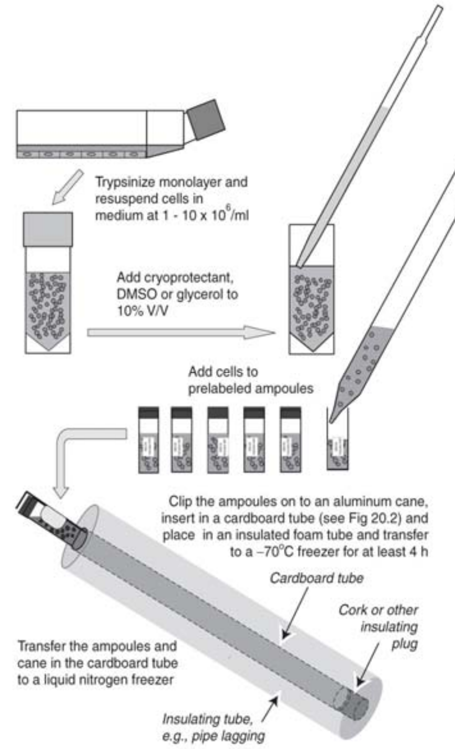
نکته ایمنی) در مواقع قرار دادن آمپول ها در نیتروژن مایع باید دستکش های محافظ و ماسک صورت استفاده شود.

۱۱- وقتی که آمپول ها در فریزر قرار گرفتند، اطلاعات لازم را در دفتر یادداشت فریزر ثبت کنید.

پرونده های فریزر

پرونده ها باید شامل a) یک فهرست موجودی در هر قسمت از فریزرها b) فضاهای آزاد ذخیره سازی و c) یک فهرست از سویه سلولی توصیف کننده رده سلولی، معرفی رده سلولی، منشاء آن، جزئیات روش های نگهداری و منجمد کردن، ویژگی های اختصاصی و موقعیت آنها باشد. این یادداشت ها ممکن است به صورت سنتی نگهداری شده اما یک بانک اطلاعاتی کامپیوتری باعث ذخیره و بازیابی بهتر اطلاعات می شود.

ذوب کردن آمپول های ذخیره شده



شکل ۸-۱۲: منجمد کردن سلولها. سلولهای تریپسینه شده در محیط کشت حاوی ماده محافظ در برابر انجماد در داخل آمپول ها توزیع شده و سپس در یک کن آلومینیومی گذاشته شده و در داخل یک لوله نازک جایگزین شده و سپس در داخل یک لوله عایق بندی شده قرار داده می شوند. لوله و محتویات آن قبل از انتقال به فریزر نیتروژن مایع به مدت ۴ ساعت یا یک شب در دمای ۷۰°C- یا ۸۰°C- گذاشته می شوند.

می توان در آب گرم در یک ظرف یا در حمام آب انجام داد اما اگر آمپول در طی ذخیره سازی در نیتروژن مایع غوطه ور شده باشد ، حمام آب باید دارای پوشش باشد زیرا اگر نیتروژن مایع به داخل آمپول وارد شده باشد در هنگام گرم کردن شدیداً منفجر می شود.

سوسپانسیون سلولی باید بعد از ذوب کردن، آهسته رقیق شود زیرا رقیق کردن سریع میزان زیستایی را کاهش می دهد. این فرآیند تدریجی مخصوصاً در مورد DMSO مهم می باشد زیرا رقیق کردن ناگهانی می تواند باعث آسیب اسمزی شدید شده و بقاء سلولی را تا نصف کاهش می دهد. اغلب سلولها به سانتریفوژ کردن نیاز ندارند، زیرا برای سلولهای تک لایه تعویض محیط در روز بعد یا برای کشت های سوسپانسیون، رقیق کردن کافی خواهد بود. هر چند بعضی از سلولها (اغلب سلولهایی که به صورت سوسپانسیون رشد می کنند) به عوامل محافظت کننده در برابر انجماد مخصوصاً DMSO حساس تر بوده و باید بعد از ذوب کردن سانتریفوژ شوند اما هنوز هم لازم است که ابتدا در محیط کشت آهسته رقیق شوند.

دستور کار۲-۱۲- ذوب کردن سلولهای منجمد شده

طرح کلی

سلولها را سریع ذوب کرده آنها را آهسته رقیق کرده و با دانسیته سلولی بالا بذرافشانی کنید.

مواد

استریل:

فلاسک کشت

لوله سانتریفوژ

محیط کشت رشد

پی پت های ۱mL و ۱۰ mL

سرنگ و سر سرنگ 19-g (در صورت استفاده از آمپول های شیشه ای)

غیر استریل:

دستکش های محافظ و ماسک صورت

آب استریل با دمای ۳۷ °C و عمق ۱۰cm در یک ظرف در دار تمیز که با الکل سواب شده است

پنس

الکل ۷۰٪

سواب

نفتالن بلک (آمیدو بلک) ۱٪ یا تریپان بلو ۰/۴٪

دستور کار

۱- دفترچه فریزر را چک کرده تا مکان آمپولی که باید ذوب شود مشخص شود.

۲- مواد را جمع آوری کرده، محیط کشت را آماده کرده و بر روی فلاسک کشت بر چسب بزنید.

۳- آمپول را از فریزر خارج کرده، برچسب آن را چک کرده و اگر آمپول در نیتروژن مایع غوطه ور نشده بود، آن را در آب استریل ۳۷°C در یک بشر، ظرف پلاستیکی یا حمام آب قرار دهید. در صورت امکان از خیس شدن در پوش آمپول جلوگیری شود زیرا باعث افزایش شانس آلودگی می شود.

نکته ایمنی) یک روپوش آزمایشگاهی بسته و دستکش باید در هنگام خارج کردن آمپول از فریزر پوشیده شده باشد. اگر آمپول به صورت غوطه ور در نیتروژن مایع ذخیره شده باشد، باید یک ماسک صورت یا عینک محافظ به اضافه روپوش آزمایشگاهی بسته و دستکش پوشیده شود . آمپول های ذخیره شده در فاز مایع ممکن است نیتروژن مایع را در خود کشیده باشند و در هنگام ذوب شدن شدیداً

جدول ۱-۱۲: ثبت رده سلولی

Cell line	**Freeze date:**									New card
	Location:									

Species Normal/ neoplastic Adult/ Fetal/NB	**Mycoplasma:** Method Date of test Result	**Freeze instructions:** Rate Cryoprotectant %
Tissue Site Pass./ Gen. No	**Authentication:**	**Thaw instructions:** Thaw rapidly to 37°C
Author Ref. Mode of growth	Date of test Method	Dilute to: 5 mL 10 mL 20 mL 50 mL
	Normal Maintenance:	Centrifuge to remove cryoprotectant? Yes/No
Special characteristics:	Subculture frequency Seeding conc. Agent Medium change frequency Type Serum, etc.. . . . . . %	**Special requirements**
	Gas phase Buffer pH	
Person completing card Date	**Any other special conditions**	**Biohazard precautions:**

منفجر شوند. در این صورت یک سطل پلاستیکی دارای درپوش باید برای ذوب کردن استفاده شود.

۴- وقتی که آمپول ذوب شد، برچسب آن را دوبار چک کرده تا از درست بودن سلولها مطمئن شوید؛ سپس آمپول را به طور کامل با الکل ٪۷۰ سواب کرده و آنرا در یک هود لامینار فلو باز کنید.

۵-محتویات آمپول را با یک پی پت ۱mL به یک فلاسک کشت انتقال دهید.

۶- محیط کشت را آهسته به سوسپانسیون سلولی اضافه کنید : ۱۰mL در حدود بیش از ۲ دقیقه ابتدا به صورت قطره قطره وسپس کمی سریعتر اضافه می شود و به تدریج سلولها و ماده محافظ در برابر انجماد رقیق می شوند.

برای سلولهایی که برای خارج کردن ماده محافظ در برابر انجماد به سانتریفوژ کردن نیاز دارند :

جدول ۲-۱۲: ثبت فریزر

Position: Freezer no. . . . . . . Canister/Section no. . . . . . Tube/drawer no. . . . .

Cell strain/line: . . . . Freeze date . . . . Frozen by . . . .

No. of ampoules frozen . . . . No. of cells/ampoule . . . . in . . . . . . mL

Growth medium . . . . Serum . . . . Conc. . . . . . . Freeze medium . . . .

Method of cooling . . . . Cooling rate . . . . . .

Thawing record:

Thaw date	No. of ampoules	No. left	Seeding			Viability			Notes
			Conc.	Vol.	Medium	Dye exclusion	~% attached by 24 h	Cloning efficiency	

a) سلولها را آهسته مطابق مرحله ۶ اما در یک لوله سانتریفوژ یا ظرف یونیورسال رقیق کنید.
b) آنها را به مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰ g سانتریفوژ کنید.
c) محیط کشت سوپرناتانت حاوی ماده محافظت کننده در برابر انجماد را دور بریزید.
d) سلولها را در محیط کشت رشد تازه به حالت تعلیق در آورید.
e) برای کشت در فلاسک بذرافشانی کنید.

۷- سلولهای باقی مانده در آمپول را می توان با نفتالن بلک یا تریپان بلو برای تعیین میزان زیستایی رنگ کرد.

۸- بعد از ۲۴ ساعت چک شود :

a) برای سلولهای تک لایه چسبنده، اتصال آنها را تایید کرده و سعی کنید برحسب عکس سلولها در دانسیته مورد انتظار ($cells/cm^2$) با بقاء کامل، درصد بقاء را به دست آورید.
b) برای سلولهایی که به صورت سوسپانسیون رشد می کنند، ظاهر آنها را چک کرده(سیتوپلاسم شفاف و فاقد حالت دانه دانه) و تا غلظت بذرافشانی عادی رقیق کنید. اگر سلولها شمارش شده و میزان زیستایی به دست آورده شود این کار دقیق تر انجام شده و در این صورت سلولها را می توان تا غلظت بذرافشانی عادی سلولهای زنده رقیق کرد.

میزان زیستایی که از روش جلوگیری از ورود رنگ (dye exclusion) به دست آمده باید بر روی برگ ثبت یا فایل مناسب ثبت شده تا برای ذوب کردن در آینده استفاده شود. از هر انجماد جدید باید یک آمپول ذوب شود تا موفقیت عملکرد تأیید شود.

فلاسک های انجماد: ممکن است کل فلاسک با رشد سلولها تا مرحله انتهایی فاز لگاریتمی و افزودن ٪۱۰-۵ DMSO به کمترین حجم محیط کشت که بتواند به طور مؤثر تک لایه را بپوشاند و قرار دادن فلاسک در یک ظرف پلی استیرن با ضخامت دیواره ۱۵mm منجمد شود. ظرف عایق در یک فریزر ۷۰- ºC تا ۹۰- ºC قرارداده می شود و به میزان

حدود ۱ ^{o}C در هر دقیقه سرد می شود. تا زمانی که فلاسک در ظرف خود از فریزر خارج نشود، بقاء برای چند ماه خوب است. همچنین ممکن است پلیت های ۲۴ خانه به همین طریق با ۱۵۰ µl محیط کشت انجماد در هر چاهک منجمد شوند و این روش را می توان برای ذخیره سازی تعداد زیادی از کلون ها در طی روش های ارزیابی استفاده کرد.

طراحی و کنترل استوک ها ی فریزر

به محض این که سلولهای حاصل از واکشت یک کشت اولیه یا یک رده سلولی تازه به دست آمده، مازاد بر نیاز باشند و مشخص شود که عاری از آلودگی می باشند، باید تعدادی آمپول از آن سلولها منجمد شوند که به آنها *token freeze* گفته می شود. وقتی که رده سلولی به طور موفقیت آمیز تکثیر شد یا یک سویه سلولی کلون شده با ویژگی های مورد نظر انتخاب شد و هویت و عاری بودن از آلودگی آن تأیید شد، یک استوک بذر (seed stock) باید به صورت منجمد ذخیره شود.

کنترل موجودی فریزر

استوک بذر باید حفاظت شده و نباید در موارد عادی در دسترس باشد. وقتی یک آمپول ذوب می شود تا زیستایی استوک بذر چک شود و اگر استفاده از رده سلولی در آینده نزدیک انتظار می رود، سلولها را می توان برای استوک توزیع (distribution stock) رشد داد. آمپول های این استوک در صورت نیاز در اختیار افراد قرار می گیرد. این افراد در صورتی که به این استوک در فاصله زمانی طولانی نیاز داشته باشند باید استوک های مصرف کننده (user stocks) مخصوص خود را منجمد کنند و زمانی که کار آنها با استوک تمام شد باید دور ریخته شود. استوک های مصرف کننده هرگز نباید در اختیار مصرف کننده دیگری قرار گیرد زیرا به طور کامل تایید نشده اند. مصرف کنندگان جدید باید یک کشت یا آمپول از استوک توزیع درخواست کنند. وقتی که استوک توزیع تمام شد، می توان آن را از استوک بذر مجدداً جایگزین کرد. وقتی که استوک بذر به کمتر از ۵ آمپول رسید، باید قبل از خارج کردن آمپول دیگر و با حداقل افزایش در شماره نسل از اولین انجماد آن را مجدداً پر کرد.

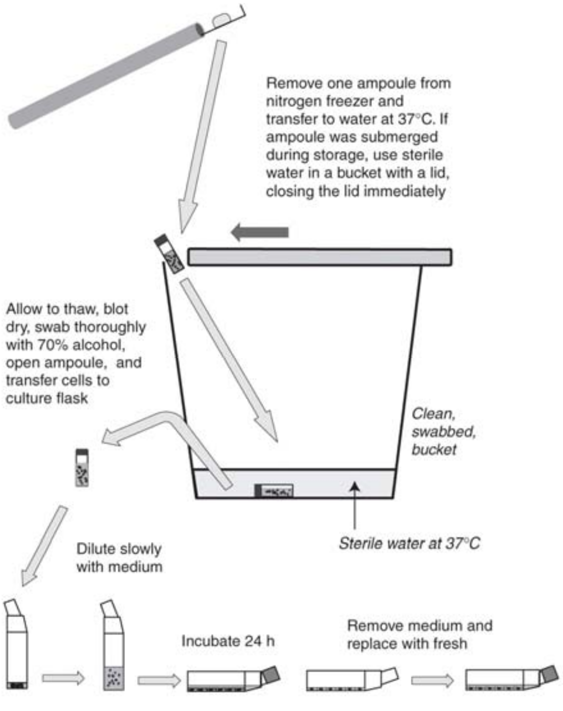
جایگزینی سریال استوک کشت

کشت های استوک باید با فواصل زمانی منظم از فریزر جایگزین شده تا اثرات رانش ژنتیکی (genetic drift) و تغییرات فنوتیپی به حداقل برسد. پس از اینکه یک رده سلولی به مدت ۲/۵ ماه در کشت بوده، ویال دیگری را ذوب کرده، خصوصیات آنرا چک کرده، و پس از اینکه مطمئن شدید عاری از آلودگی است، آنرا رشد داده تا جایگزین استوکهای موجود شود. استوکهای موجود را زمانیکه به مدت ۳ ماه خارج از فریزر بودند دور ریخته و استوک های جدید را جایگزین آنها کنید. این فرایند را در مورد سلولهایی که دارای یک زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) حدود ۲۴ ساعت می باشند هر ۳ ماه یکبار تکرار کنید. رده های سلولی که دارای زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) کوتاهتر یا بلندتر می باشند، ممکن است به ترتیب به فواصل زمانی کوتاهتر و یا بلندتری برای جایگزینی نیاز داشته باشند

.

بانک های سلولی (cell banks)

چندین بانک سلولی برای ذخیره سازی مطمئن و توزیع رده های سلولی معتبر وجود دارد. بعنوان یک قانون کلی، ترجیح داده می شود که استوک بذر اولیه از یک بانک سلولی معتبر تهیه شده که تعیین ویژگیهای لازم و کنترل کیفیت بر روی آن انجام شده باشد. بعلاوه قویاً توصیه می شود که شما کشت های با ارزش را به یک بانک سلولی ارائه کرده تا علاوه بر نگهداری از آن، امکان توزیع آن در بین افراد دیگر را فراهم سازد. بعضی از بانک های سلولی اطلاعات مربوط به رده های سلولی را به صورت on line در دسترس افراد می گذارند.



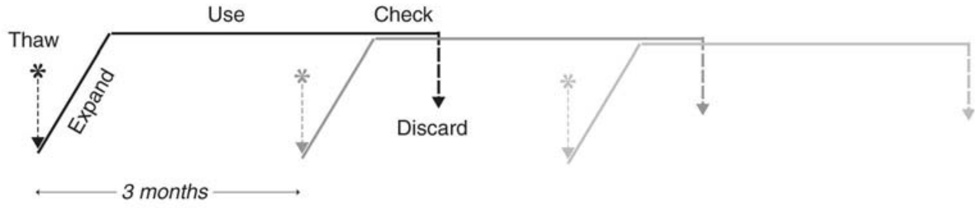
شکل ۹-۱۲: ذوب کردن سلولها. آمپول ها از فریزر خارج شده و سریع در آب گرم در زیر پوشش ذوب می شوند زیرا در صورتی که آمپول ها در فاز مایع ذخیره شده باشند خطر انفجار وجود خواهد داشت.

انتقال دادن سلولها

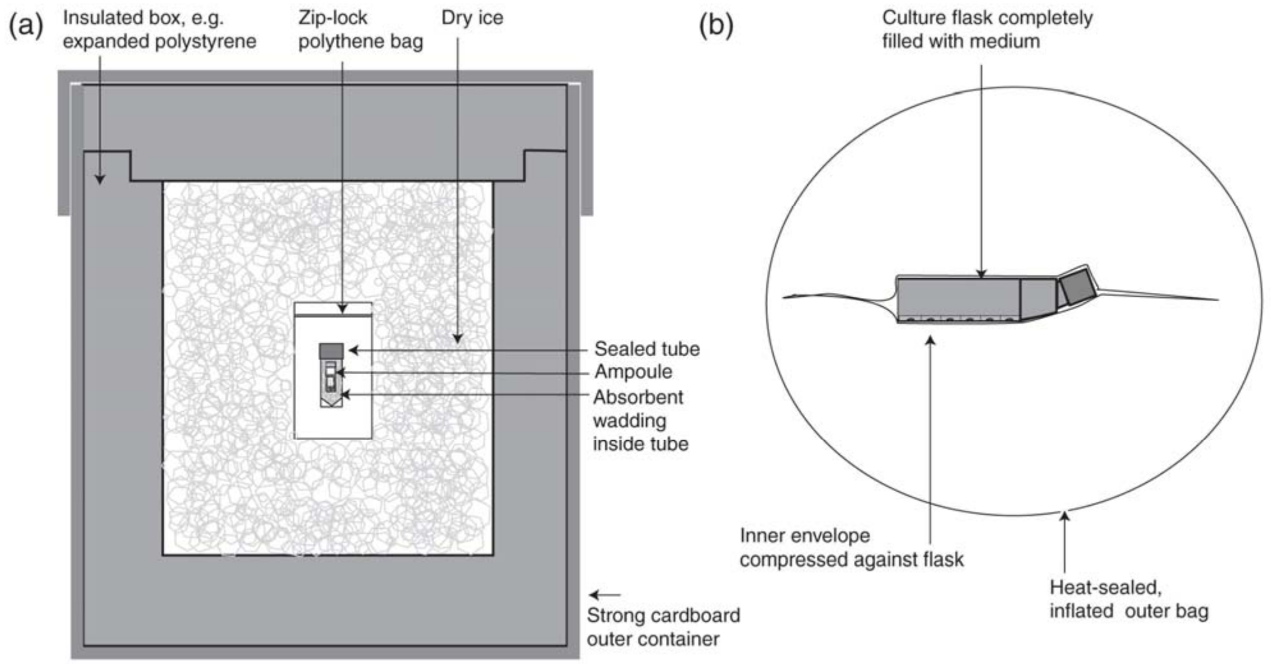
رده های سلولی را می توان به صورت ویالهای منجمد شده یا بصورت کشت های فعال از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر انتقال داد.

آمپول های منجمد شده

آمپول های منجمد را در CO_2 جامد در یک جعبه فوم پلی استیرن دارای دیواره ضخیم حمل کنید. آمپول را هر چه سریعتر از فریزر نیتروژن مایع به CO_2 جامد انتقال دهید، زیرا به میزان حدود ۱۰-۲۰°C در هر دقیقه گرم شده و نباید دمای آن به بالاتر از ۵۰°c – برسد. یک لوله سانتریفوژ پلی پروپیلن در دار را در CO_2 جامد در یک جعبه عایق قرار دهید. آمپول را از فریزر خارج کرده، سریع آن را در دستمال کاغذی جاذب (در صورت نشتی) پیچیده و آن را در لوله پلی پروپیلن قرار داده و در لوله را محکم ببندید. جعبه باید حدود ۳۰×۳۰×۳۰cm با ضخامت دیواره ۵cm و یک فضای مرکزی حدود ۲۰×۲۰×۲۰cm باشد. شما حدود ۵kg CO_2 جامد برای پر کردن فضای مرکزی نیاز دارید. معمولاً اگر سلولها درست بسته بندی شوند آنها تا ۳ روز به صورت منجمد باقی می مانند اما اگر آهسته ذوب شوند، زیستایی آنها سریع کاهش می یابد. وقتی که سلولها در CO_2 جامد حل می شوند باید حمل کننده مطلع باشد. در موقع دریافت، آمپول ها باید ذوب شده و همانند حالت طبیعی بذرافشانی شوند.



شکل ۱۰-۱۲: جایگزینی کشت به صورت سریال. یک آمپول، ذوب شده و سلولها تا میزان مورد نظر برای استفاده منظم رشد داده می شوند و به مدت ۳ ماه نگهداری می شوند. سه ماه پس از اولین ذوب، یک آمپول جدید ذوب شده و رشد داده می شود. بعد از چک کردن خصوصیات استوک جدید، استوک قدیمی دور انداخته می شود، چرخه هر سه ماه یکبار تکرار می شود به طوری که هیچ کدام از کشت ها به مدت بیش از ۳ ماه استفاده نمی شوند.



شکل ۱۱-۱۲: محفظه مخصوص انتقال سلولها. سلولها به صورت آمپول فریزر شده یا به صورت کشت در حال رشد حمل می شوند. (a) جعبه مقوایی محکم با آستر پلی استیرن عایق حاوی یخ خشک که آمپول در یک لوله دارای یک لایه جاذب در داخل یک کیسه دارای در زیپی قرار گرفته و در مرکز یخ خشک گذاشته می شود. (b) محفظه پلاستیکی دو لایه که با باد کردن محفظه بیرونی فلاسک در قسمت داخلی گذاشته شده است.

فصل سیزدهم

تعیین کمیت (Quantitation)

در کشت سلولی کمیت سنجی برای بررسی خصوصیات رشد رده های سلولی مختلف برای تجزیه و تحلیل های آزمایشی و برای ایجاد شرایط کشت مناسب برای ثبات کشت اولیه و حفظ رده های سلولی مورد نیاز است. کار کردن در شرایط استریل و نیاز برای به حداقل رساندن زمانی که کشت ها خارج از انکوباتور هستند، اغلب منجر به درجه ای از سازش بین سرعت و دقت می شود. هرچند کشت اولیه و نگهداری طبیعی نیازمند یک روش کمی برای اطمینان از تکرار پذیری (reproducibility) می باشد، سرعت دستکاری برای بقاء خوب سلولی و رشد مناسب کلیدی می باشد، بنابراین در این شرایط، بعنوان مثال کاهش دقت در پی پتینگ ممکن است به دنبال دستکاری سریع قابل قبول باشد. هرچند در شرایط آزمایشی، باید دقت افزایش یابد، حتی اگر عملکرد کمی کندتر شود. هرچند یک خطای ٪۱۰ ± ممکن است در نگهداری روتین قابل قبول باشد، در شرایط آزمایشی این مقدار باید ٪۵ ± باشد.

برای اکثر فعالیت های مربوط به کشت سلولی از قبیل فاژآلایی(transfection)، تکنیکهای آمیختن سلولی، منجمد نگهداری(cryopreservation) و واکشت روتین نیاز به تعیین کمیت سلولها قبل از استفاده از آنها می باشد. تعیین کمیت شامل تعیین تعداد سلولها، اجزاء تشکیل دهنده سلولی، فعالیت های سلولی، (مثل بیان ژن، فعالیت های آنزیمی، حرکت و غیره) و کنتیک تکثیر سلولی می باشد. کمیت سنجی صحیح برای ثبات نگهداری و برای آنالیز پاسخ سلولها نسبت به تغییرات محیطی یا شرایط آزمایشی مورد نیاز می باشد. استفاده از یک تعداد ثابت از سلولها، رشد بهینه را حفظ کرده و همچنین به استاندارد سازی روشهایی که از کشت سلولی استفاده می کنند کمک می کند.

شمارش سلولی

در حالیکه وضعیت رشد یک کشت را می توان از ظاهر آن زیر میکروسکوپ حدس زد، استاندارد سازی شرایط کشت و آزمایشات کمی صحیح مشکل بوده، مگر اینکه سلولها قبل، بعد و ترجیحاً در حین هر آزمایش شمارش شوند.

هموسیتومتر (Hemocytometer)

غلظت یک سوسپانسیون سلولی را می توان با ریختن سوسپانسیون سلولی در یک محفظه دارای ابعاد مشخص در زیر میکروسکوپ مشخص کرد. تعداد سلولها در یک ناحیه مشخص با عمق معین شمارش شده و سپس غلظت سلولی از آن بدست می آید.

دستور کار ۱-۱۳- شمارش سلولی توسط هموسیتومتر و بررسی زیستایی سلولی

مواد و وسایل

استریل:

D-PBSA

تریپسین ۰/۲۵ درصد خام

محیط کشت رشد

تریپان بلو ۰/۴ درصد (۰/۴g در ۱۰۰mL سرم فیزیولوژی) که توسط فیلتر ۰/۲۲µm صاف شده تا فاقد هر نوع ذره ای باشد

پی پت های پاستور یا سر سمپلر های زرد

غیراستریل:

سمپلر ۲۰µL یا سمپلر قابل تنظیم ۱۰۰ µL

هموسیتومتر (نئوبار اصلاح شده)

Tally counter

میکروسکوپ

احتیاط) تریپان بلو سمی است و اگر استنشاق شده یا بلعیده شود، مضر می باشد. تریپان بلو باعث سوزش چشمها شده، پوست را تحریک کرده و باعث سرطان در حیوانات آزمایشگاهی می شود. در هنگام کار با تریپان بلو احتیاطات لازم صورت گرفته و از هود و دستکش استفاده شود.

دستور کامل

۱-از سلولها نمونه برداری کنید:

a)برای کشت های تک لایه،

i)تک لایه را تریپسینه کرده و سپس آنرا در محیط کشت به حالت سوسپانسیون در آورده تا غلظت حدود $۱۰^۶ \times ۱$ سلول در میلی لیتر حاصل شود.

ii) سوسپانسیون را به طور کامل مخلوط کرده تا سلولها پخش شوند و یک نمونه کوچک (حدود1mL) از آنرا به یک ویال یا لوله آزمایش انتقال دهید.

b)برای کشت های سوسپانسیون

i) سوسپانسیون را به طور کامل مخلوط کرده تا هر نوع توده سلولی به طور کامل پخش شود.

ii) 1mL از سوسپانسیون را به یک ویال یا لوله آزمایش انتقال دهید.

برای این روش حداقل حدود ۱×۱۰^۶ cell/mL مورد نیاز می باشد. بنابراین ممکن است که در صورت رقیق بودن سوسپانسیون سلولی، آنرا سانتریفوژ کرده (در ۱۰۰g به مدت ۲ دقیقه) و مجدداً آنرا در یک حجم مشخص کمتر به صورت سوسپانسیون در آورد.

۲-آماده سازی لام:

a)لام و لامل را با الکل ٪۷۰ کاملاً تمیز کنید. در حین تمیز کردن مراقب باشید که بر روی سطح نیمه نقره ای لام خراش ایجاد نشود.

b)لبه های لام را کمی مرطوب کرده یا برروی آن دمیده تا مرطوب شود. لامل را بر روی ناحیه شمارش نیمه نقره ای قرار داده و کمی به پایین فشار دهید. ظاهر شدن الگوهای تداخلی (حلقه های نیوتن یا رنگ های رنگین کمان بین لام و لامل، شبیه حلقه های تشکیل شده توسط روغن در آب)، نشان دهنده قرار گیری صحیح لامل برروی لام می باشد.

۳-1mL از محلول تریپان بلو به سوسپانسیون سلولی اضافه کرده (ضریب رقت ۲) و سپس نمونه سلولی را کاملاً مخلوط کرده و به آرامی پی پتینگ کنید تا هر گونه توده ای پخش شود. سپس حدود ۲۰µL از نمونه را توسط یک پی پت پاستور یا سمپلر بردارید. اجازه ندهید که مایع در پی پت پاستور بالا رود چون باعث از دست رفتن سلولها می شود.

۴-سر سمپلر یا پی پت پاستور را در محل تماس بین محفظه شمارش و لامل قرار داده و اجازه دهید که سوسپانسیون سلولی وارد محفظه شمارش شود. هیچگونه فشاری برای اینکار لازم نمی باشد زیرا مایع به خاطر خاصیت موئینه وارد محفظه می شود. محفظه را کمتر یا بیشتر از مقدار مورد نیاز پر نکنید، در غیر اینصورت، ممکن است به دلیل تغییرات فشار سطحی ابعاد آن تغییر یابد.

۵-مجدداً ۲۰µL از سوسپانسیون سلولی را برداشته و محفظه دوم هموسیتومتر را پر کنید.

۶-هر گونه مایع اضافی را پاک کرده (بدون اینکه مایع از زیر لامل به بیرون کشیده شود) و لام را روی صفحه میکروسکوپ قرار دهید.

۷-عدسی شیئی ×۱۰ را انتخاب کرده و برروی خطوط مشبک در داخل محفظه فوکوس کنید.

۸-لام را به گونه ای حرکت دهید که میدانی که شما می بینید ناحیه مرکزی شبکه و بزرگترین ناحیه ای باشد که شما قادرید به صورت خط موازی ببینید. این ناحیه $1mm^2$ می باشد. با یک عدسی شیئی استاندارد ×۱۰ برحسب میدان دید این ناحیه تقریباً میدان دید را پر کرده و یا گوشه های آن کمی بیرون از میدان دید می باشد.

۹-تعداد سلولها (رنگ شده و رنگ نشده را به صورت مجزا) در این ناحیه $1mm^2$ شمارش کنید. سلولهایی را که بر روی خطوط بالایی و خطوط سمت چپ هر مربع قرار گرفته اند را در داخل مربع فرض کرده و شمارش کنید اما آنهایی که بر روی خطوط پایینی یا سمت راست هستند را خارج فرض کرده و نشمارید.

برای کشت روتین سعی کنید بین ۳۰۰-۱۰۰ سلول در هر mm^2 شمارش شود. هرچه تعداد سلولهای شمارش شده بیشتر باشد، دقت شمارش افزایش می یابد. برای آزمایشات کمی دقیق تر بهتر است ۱۰۰۰-۵۰۰ سلول شمارش شود .

a)اگر تعداد سلولها خیلی کم بود ($<۱۰۰/mm^2$) ، یک یا تعداد بیشتری از مربع های (هر کدام $1mm^2$) احاطه کننده مربع مرکزی را شمارش کنید.

b)اگر تعداد سلولها خیلی زیاد بود ($>۱۰۰۰/mm^2$) فقط پنج مربع کوچک (که هر کدام توسط سه خط موازی احاطه شده اند) را در امتداد قطر مربع بزرگتر ($1mm^2$) شمارش کنید.

۱۰- با حرکت دادن صفحه میکروسکوپ، محفظه دوم هموسیتومتر را مشاهده کرده و تعداد سلولها را در آن شمارش کنید.

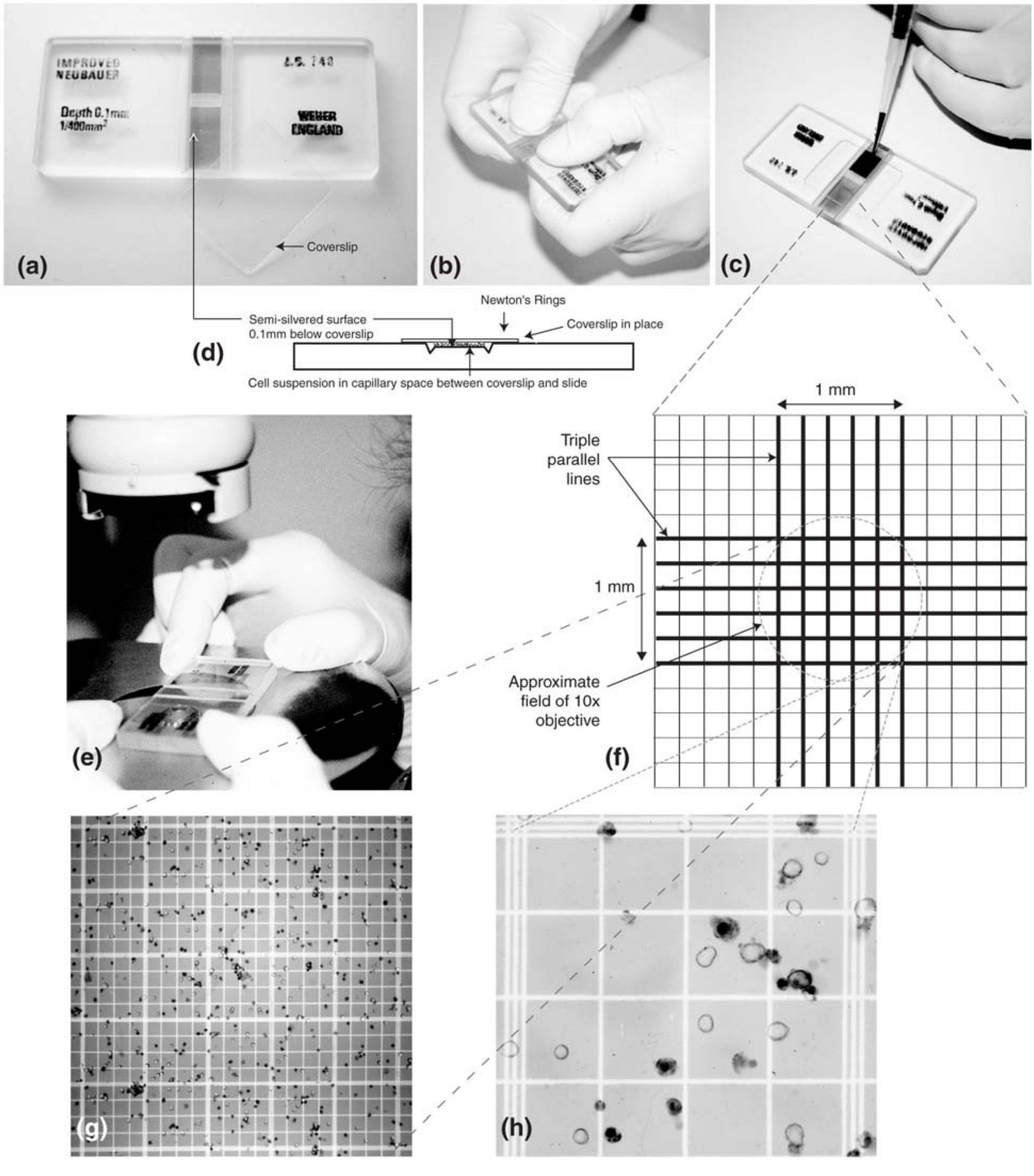
تجزیه و تحلیل داده ها:

تعداد کل سلولهای زنده $= A\times B\times C\times ۱۰^۴$

تعداد کل سلولهای مرده $= A\times B\times D\times ۱۰^۴$

تعداد سلولهای مرده + تعداد سلولهای زنده = تعداد کل سلولها

زیستایی = (تعداد سلولهای زنده / تعداد کل سلولها) ×٪۱۰۰



شکل ۱-۱۳: استفاده از یک لام هموسیتومتر. (a) لام هموسیتومتر(نئوبار اصلاح شده) و لامل قبل از استفاده. (b) قرار دادن لامل بر روی لام. (c) اضافه کردن سوسپانسیون سلولی به لام. (d) مقطع طولی لام که موقعیت نمونه سلولی را در محفظه دارای عمق mm ۰/۱ نشان می دهد. (e) مشاهده لام در زیر میکروسکوپ. (f) نمای بزرگنمایی شده از کل ناحیه مشبک لام. ناحیه مرکزی که با دایره نقطه چین احاطه شده است، ناحیه ای است که توسط عدسی × ۱۰ پوشش داده می شود. این ناحیه تقریباً مربع mm ۱×۱ مرکزی ناحیه مشبک را شامل می شود. (g) عکس میکروسکوپی با بزرگنمایی کم (عدسی شیئی ×۱۰) که ۲۵ مربع کوچکتر µm ۲۰۰×۲۰۰ لام را که مربع mm ۱×۱ مرکزی لام را تشکیل می دهند، نشان می دهد. سلولها با نفتالن بلک(آمیدوبلک) رنگ شده اند.. (h) عکس میکروسکوپی با بزرگنمایی بالا(عدسی شیئی ×۴۰) از یکی از مربع هایµm ۲۰۰ کوچکتر که توسط سه خط موازی محصور شده و حاوی ۱۶ مربع کوچکتر (µm۵۰×۵۰) می شود. سلولهای زنده رنگ نمی شوند و شفاف بوده و یک حلقه منعکس کننده نور در اطراف آنها وجود دارد. سلولهای مرده تیره بوده و هیچ گونه حلقه منعکس کننده نور ندارند.

که در آن

A: حجم سلولها

B: ضریب رقت در تریپان بلو

C: میانگین تعداد سلولهای رنگ نشده (زنده)

D: میانگین تعداد سلولهای رنگ شده (مرده)

$۱۰^{۴}$: تبدیل $۰/۱\ mm^3$ به میلی لیتر

برای لام نئوبار اصلاح شده(improved neubar)، عمق محفظه ۰/۱mm بوده و بنابراین حجم هر مربع بزرگ ($۱mm^2$) برابر خواهد بود با:

$۱mm \times ۱mm \times ۰/۱\ mm = ۱۰^{-۴}\ mL$

روش شمارش سلولها با استفاده هموسیتومتر، یک روش ارزان بوده و امکان مشاهده سلولهایی را که شمارش می کنید برای شما فراهم می سازد. در صورتی که در هنگام شمارش سلولها هدف فقط مشخص کردن غلظت سلولی بوده و تعیین زیستایی مورد نظر نباشد، شمارش را بدون استفاده از تریپان بلو انجام دهید و تعداد کل سلولها را شمارش کنید.

از معایب این روش این است که نسبتاً کند بوده و هم در روش نمونه برداری و هم در تعداد کل سلولهای شمارش شده مستعد خطا می باشد. اغلب خطاها با نمونه برداری و انتقال نادرست سلولها به محفظه روی می دهد. قبل از نمونه برداری مطمئن شوید که سوسپانسیون سلولی به طور کامل مخلوط شده است و به سلولها زمان لازم برای ته نشین شدن یا چسبیدن به سر پی پت پاستور، قبل از انتقال آنها به داخل محفظه هموسیتومتر را ندهید. همچنین مطمئن شویدکه سوسپانسیون به صورت تک سلولی می باشد، چون توده های سلولی باعث خطاء در شمارش می شوند. توده های بزرگ ممکن است آهسته وارد محفظه شده و یا اصلاً قادر به ورود به آن نباشند. اگر در طی آماده سازی سوسپانسیون سلولی قادر به برطرف کردن توده های سلولی نبودید، سلولها را در اسید سیتریک ۰/۱M حاوی ٪۰/۱ کریستال ویوله در ۳۷°C به مدت یک ساعت لیز کرده و سپس تعداد هسته ها را شمارش کنید.

عوامل ایجاد خطاء در روش شمارش سلولها توسط هموسیتومتر:

۱-حضور حباب های هوا و ذرات زائد در محفظه شمارش

۲-پرکردن بیش از حد محفظه شمارش

۳-پرکردن ناکافی محفظه شمارش

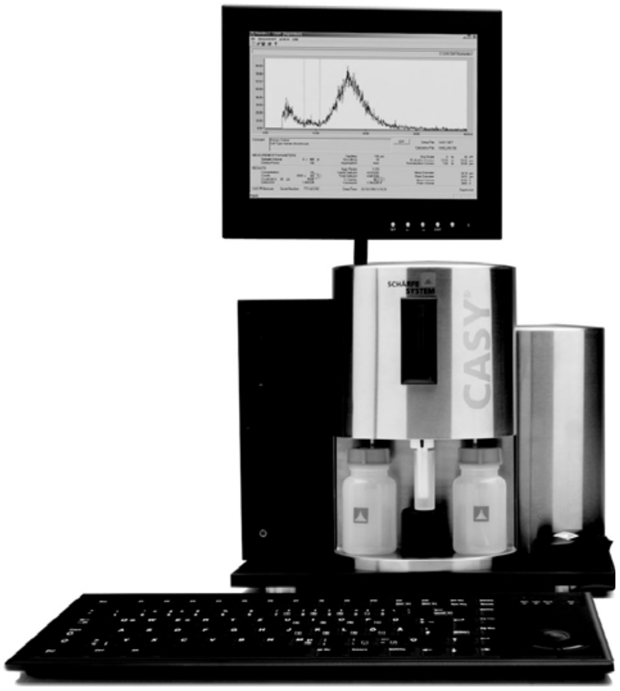
۴-پخش غیر یکنواخت سلولها در محفظه شمارش

۵-تعداد بسیار کم سلولها(غلظت پایین سلولی): این مشکل را می توان با سانتریفوژ کردن سلولها و معلق سازی مجدد آنها در حجم کمتر مرتفع ساخت.

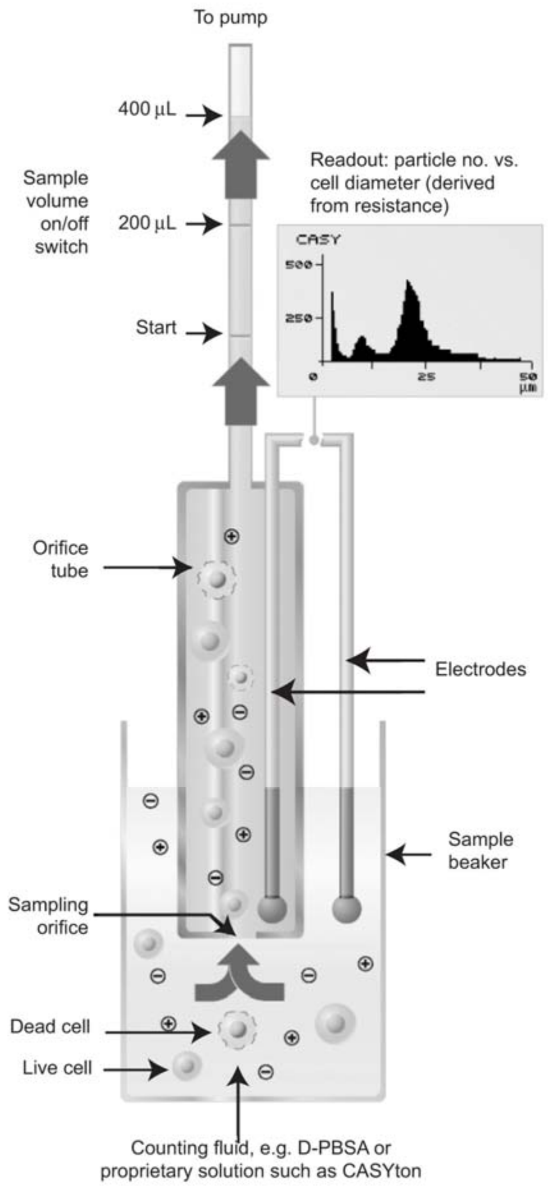
۶-تعداد بسیار زیاد سلولها (غلظت بالای سلولی): این مشکل را می توان با استفاده از ضریب رقیق سازی بالاتر در تریپان بلو مثلاً ۱:۱۰ بر طرف کرد.

شمارش الکترونیکی

دراین روش سلولها از طریق یک منفذ کوچک به داخل کشیده شده و در حین عبور، باعث افزایش مقاومت الکتریکی جریان عبوری از منفذ، متناسب با حجم سلولها می شوند و تولید یک سری از پالس ها را می کنند که این پالس ها مرتب شده و شمارش می شوند. وقتی شمارش شروع می شود حجم مشخصی از سوسپانسیون سلولی از طریق منفذ کشیده می شود. هر سلول با عبور از منفذ، متناسب با حجم خود، جریان عبور یافته از منفذ را تغییر می دهد. این تغییر در مقاومت، ایجاد پالس($amps^{-1}$) کرده که توسط دستگاه تقویت کننده (آمپلی فایر) تقویت شده و شمارش می شود. چون اندازه هر پالس متناسب با حجم سلول (یا هر ذره دیگر) می باشد، تولید پالسهایی با ارتفاعهای متفاوت می شود.



شکل ۲-۱۳: دستگاه سلول شمار الکترونیکی CASY. دستگاه سلول شمار CASY1 برای تعیین اندازه سلولها و افتراق بین سلولها زنده و سلولهای غیر زنده و سلولهای منفرد و توده ها مناسب می باشد.



شکل ۳-۱۳: طرز کار دستگاه سلول شمار CASY. الکترولیت (مثل D-PBSA یا CASYton) در یک لوله منفذدار به یک پمپ متصل شده و یک مقدار مشخص از نمونه سلولی را از بشر می کشد. وقتی که سلول از منفذ عبور می کند میزان جریان عبوری تغییر کرده و یک سیگنال تولید می شود که میزان آن متناسب با حجم سلول می باشد.

دستور کار۲-۱۳- شمارش الکترونیکی سلولها توسط مقاومت الکتریکی

طرح کلی

یک نمونه از سلولها را در الکترولیت رقیق کرده(محلول نمکی فیزیولوژیک یا D-PBSA)، نمونه رقیق شده را در زیر لوله قرار داده و با کشیدن ۰/۵ mL از نمونه رقیق شده در دستگاه، سلولها را شمارش کنید.

مواد

استریل یا تهیه شده به روش استریل:

کشت سلولی
D-PBSA
تریپسین خام ۰/۲۵ درصد
محیط کشت رشد

غیر استریل:

ظروف مخصوص شمارش(counting cups)

دستور کار

۱- تک لایه سلولی را تریپسینه کرده یا یک نمونه از کشت سوسپانسیون بردارید. سلولها باید به خوبی مخلوط شده و بصورت سوسپانسیون تک سلولی باشند.

۲- نمونه سوسپانسیون سلولی را داخل یک بشر ۲۵mL یا ظرف نمونه برداری یکبار مصرف با ۲۰mL از مایع مخصوص شمارش (counting fluid) به نسبت ۱:۵۰ رقیق کنید.

نکته) توزیع سریع مایع شمارش می تواند منجر به ایجاد حباب های هوا شود که در دستگاه شمارشگر شمارش خواهند شد. در نتیجه، مایع شمارش باید چند لحظه قبل از شمارش ثابت نگه داشته شود. اگر مایع ابتدا توزیع شود و سپس سلولها به آن اضافه شوند، این مشکل به حداقل می رسد.

۳- سوسپانسیون را به خوبی مخلوط کرده و آنرا در زیر نوک لوله منفذ دار قرار دهید. مطمئن شوید که منفذ پوشیده بوده و الکترود بیرونی در مایع شمارش در بیشتر نمونه غوطه ور است.

۴- برنامه دستگاه را تنظیم کنید.

a) تنظیم آستانه (حداقل اندازه سلول معمولاً ۷µm)
b) حذف پس زمینه (در صورت استفاده)
c) حجمی که باید شمارش شود(معمولاً ۰/۵mL)
d) تنظیم رقت (مثلاً ۵۰ اگر ۰/۴mL در ۲۰mL از D-PBSA شمارش می شود)

۵- صفحه آنالوگ را چک کنید.

a) برای اطمینان از اینکه تمام سلولها در تنظیم(های) آستانه قرار می گیرند؛
b) برای چک کردن زیستایی یا بقایای سلولی[که با یک خمیدگی(shoulder) بر روی منحنی یا هیستوگرام مشخص شده و زیر تنظیم آستانه طبیعی قرار می گیرد].
c) برای چک کردن تجمع (که توسط ذراتی که بالای محدودهٔ اندازه طبیعی هستند نشان داده می شود).

۶- شمارش سلولی را شروع کنید.

۷-وقتی چرخه شمارش کامل شد، توزیع اندازه بر روی صفحه آنالوگ ظاهر خواهد شد. سوئیچ کردن به صفحه دیجیتال، تعداد سلول در میلی لیتر را خواهد داد.

تجزیه و تحلیل: اگر زمینه و رقت درست تنظیم شده باشد، غلظت سلولی مطابق با سوسپانسیون اولیه قبل از رقیق کردن با مایع شمارش می باشد. در غیر اینصورت، اگر دستگاه شمارشگر به گونه ای تنظیم شده است که ۰/۵mL از یک رقت ۱:۵۰ را شمارش کند، شمارش نهایی باید در عدد ۱۰۰ ضرب شود تا غلظت سلولی در هر میلی لیتر سوسپانسیون سلولی اولیه بدست آید. بعضی از دستگاهها به صورت اتوماتیک ضریب رقت را جبران می کنند، بنابراین راهنمای استفاده از دستگاه را از این نظر بررسی کنید.

تکثیر سلولی

اغلب، اندازه گیری میزان تکثیر سلولی برای تعیین پاسخ سلولها به یک محرک یا سم خاص استفاده می شود. همچنین تعیین میزان رشد بافت در نگهداری روتین مهم است، چون یک عامل اساسی برای ثبات کشت بوده و دانستن بهترین زمان برای واکشت، رقت بهینه، کارایی پلیتینگ (plating efficiency) تقریبی در دانسیته های مختلف سلولی، تست کردن محیط کشت، سرم، ظروف کشت جدید یا بسترها و غیره همگی نیازمند ارزیابی کمی می باشند.

طراحی تجربی (experimental design)

دانستن مرحله رشد یک کشت و پارامترهای کنتیکی آن، در طراحی آزمایشهای کشت سلولی ضروری می باشد. کشت ها در مرحله تأخیر(lag)، دوره رشدنمایی (مرحله log) و فاز سکون (plateau) در بسیاری از خواص به میزان زیادی با هم متفاوت می باشند. بنابراین در نظر گرفتن وضعیت رشد هم در شروع یک آزمایش و هم در زمان نمونه برداری به منظور تعیین این که آیا در حالت تکثیر می باشد و یا نه و اگر هست، طول مدت زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) و زمان چرخه سلولی مهم می باشد. سلولهایی که وارد فاز ایستایی شده اند دارای میزان رشد بسیار کم و مورفولوژی متفاوت بوده و ممکن است قطبی(polarized) شوند این سلولها عموماً تمایل دارند ماتریکس خارج سلولی بیشتری را ترشح کرده و ممکن است جداسازی آنها مشکل باشد. معمولاً، کشت های سلولی در فاز لگاریتمی با ثبات تر و یکنواخت تر بوده و نمونه برداری در انتهای فاز لگاریتمی بالاترین راندمان و بیشترین تولید را می دهد.

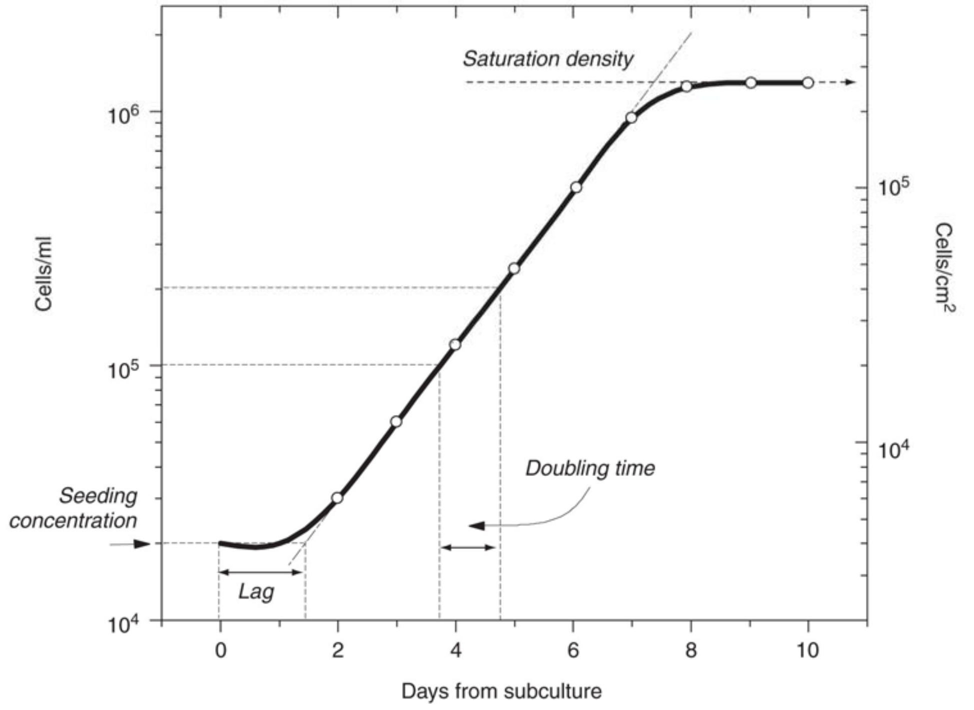
همچنین در نظر گرفتن تاثیرات طول مدت زمان یک آزمایش بر روی انتقال از یک حالت به حالت دیگر مهم است. افزودن یک دارو در اواسط فاز نمایی و سنجش کردن بعدی آن ممکن است بر حسب بر اینکه وقتی جمع آوری می شود در رشد نمایی بوده و یا وارد فاز ایستایی شده باشد، متفاوت می باشد. برنامه ریزی برای تیمار و نمونه برداری نیازمند اطلاعات بیشتری از پارامترها چرخه رشد می باشد.

چرخه رشد

همانگونه که قبلاً شرح داده شد، به دنبال واکشت دادن، سلولها با یک الگوی رشد مشخص از فاز تاخیر، نمایی یا فاز لگاریتمی و ایستایی یا فاز سکون به پیش می روند. فازهای لگاریتمی و ایستایی، اطلاعات لازم در مورد رده سلولی، زمان دو برابر شدن جمعیت در طی رشد نمایی و حداکثر دانسیته سلولی حاصل در فاز سکون (دانسیته اشباع) را فراهم می سازد. اندازه گیری PDT برای تعیین پاسخ سلولی نسبت به شرایط کشت تحریک کننده یا باز دارنده متفاوت از قبیل تغییر در غلظت مواد غذایی، تاثیرات هورمونی یا داروهای سمی استفاده می شود. همچنین PDT در طی پاساژ سریال یک شاخص خوبی از کشت بوده و امکان محاسبه راند مان های سلولی و ضریب رقت مورد نیاز در واکشت را فراهم می سازد.

اگر شکل منحنی رشد مشخص نباشد، نقاط زمانی واحد (single time points) برای مانیتورینگ رشد رضایت بخش نمی باشد. کاهش تعداد سلولها بعد از ۵ روز می تواند در نتیجه کاهش میزان رشد تعدادی از سلولها یا همه سلولها، یک دورهٔ تاخیر طولانی تر که دلالت بر سازگاری یا از دست رفتن سلولها دارد، (تشخیص بین این دو شکل می باشد) یا کاهش دانسیته اشباع باشد. این بدان معنی نیست که گفته شود منحنی های رشد دارای هیچگونه ارزشی نمی باشند. منحنی رشد می تواند برای تست کردن محیط های کشت، سرم، فاکتورهای رشد و بعضی داروها مفید باشد و وقتی که پاسخ مورد بررسی به طور کامل تعیین هویت شده و نوع پاسخ قابل پیشگویی باشد (مثلاً یک تغییر در PDT)، سپس مشاهدات نقاط زمانی واحد ممکن است کافی باشد. مخصوصاً منحنی رشد، برای تعیین دانسیته اشباع مفید می باشد، هر چند میزان رشد در دانسیته اشباع باید توسط شاخص نشاندار کردن (labeling index) با $[^{3}H]$ – thymidine سنجش شود.

PDT بدست آمده از یک منحنی رشد نباید با چرخه سلولی یا زمان نسل اشتباه شود. PDT یک میانگین مربوط به کل جمعیت بوده و نتیجه خالص محدودهٔ وسیعی از مقادیر تقسیم و همچنین عدم تقسیم بعضی سلولها را در داخل کشت توصیف می کند. زمان چرخه سلولی یا زمان نسل از یک مرحله



شکل ۴-۱۳: منحنی رشد. طرح نیمه لگاریتمی از افزایش غلظت سلولی (محور چپ) و دانسیته سلولی (محور راست) بعد از واکشت. کشت هایی که به تعداد زیاد در فلاسک های ۲۵ cm^2 کشت داده شده اند، هر روز نمونه برداری شده و شمارش می شوند. باید امکان کشیدن یک خط مستقیم از قسمتی از نمودار که نمایانگر رشد نمایی است و به دست آوردن زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) از ناحیه میانی این خط وجود داشته باشد. زمان Lag در حد فاصل بین زمان بذرافشانی تا آغاز مرحله نمایی می باشد و دانسیته اشباع در فاز سکون در بالا و انتهای نمودار یافت می شود.

چرخه سلولی تا زمانی که دوباره به مرحله مشابه برسد را اندازه گیری می کند و فقط شامل سلولهای در حال تقسیم در جمعیت می شود. PDT تحت تاثیر سلولهایی که در حال رشد نیستند و سلولهای مرده هم قرار می گیرد. PDT ها از ۱۵-۱۲ ساعت در لوکمیاهای موشی سریع الرشد مثل L1210 تا ۳۶-۲۴ ساعت در رده های سلولی پیوسته و تا ۷۲-۶۰ ساعت در رده های سلولی متناهی کند رشد متفاوت می باشد.

دستور کار۳-۱۳- منحنی رشد تک لایه در فلاسک

طرح کلی

فلاسک ها را آماده کرده و تعداد سلولها را در فواصل زمانی روزانه شمارش کرده تا کشت به فاز سکون برسد.

مواد و وسایل

استریل یا تهیه شده به روش استریل:

کشت سلولی تک لایه A549، Veroیا HeLa-S3 در فلاسک ۷۵cm^2 در فاز تاخیر لگاریتمی................................ ۱

تریپسین ۰/۲۵٪ خام با ۱۰mM EDTA................ 5 mL

محیط کشت رشد، با ۴mM $NaHCO_3$............. ۲۰۰ mL

D-PBSA(برای شستشو و شمارش سلولی.......... ۵۰ mL

فلاسک ۲۵cm^2... ۲۴

دستور کار

۱- سلولها را همانند واکشت معمولی تریپسینه کنید.

۲- سوسپانسیون سلولی را در ۱۵۰mL از محیط کشت تا ۲ × $۱۰^۴$ cells/mL رقیق کنید.

۳- ۲۴ عدد فلاسک ۲۵cm^2 را بذرافشانی کنید.

۴- فلاسک ها را در انکوباتور در دمای ۳۷°C قرار دهید.

نکته) برای این دستور کار یک محیط کشت دارای مقدار کم بی کربنات(۴mM) استفاده می شود اما اگر یک محیط کشت دارای مقدار زیاد بی کربنات (مثلاً ۲۳ mM) استفاده

شود فلاسک ها را با ٪۵ CO_2 گازدهی کرده یا با در نیمه باز یا با در نفوذپذیر در انکوباتور CO_2 قرار دهید.

۵- بعد از ۲۴ ساعت دو فلاسک اول را از انکوباتور خارج کرده و سلولها را شمارش کنید.

a) محیط کشت را به طور کامل خارج کنید.

b) ۲ mL تریپسین/EDTA به هر فلاسک اضافه کنید.

c) فلاسک ها را به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید.

d) سلولها را در تریپسین/EDTA پخش کرده و ۰/۴mL از سوسپانسیون سلولی را به ۱۹/۶mL از D-PBSA اضافه کنید.

e) تعداد سلولها را توسط دستگاه شمارشگر الکترونیکی شمارش کنید.

۶- همانند مراحل ۵ نمونه بردای را ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تکرار کنید.

۷- در صورتیکه pH محیط کشت کاهش یافته است ، آنرا بعد از ۷۲ ساعت یا زودتر تعویض کنید.

۸- نمونه برداری روزانه را برای سلولهای سریع الرشد(یعنی سلولهایی که دارای یکPDT، ۱۴-۱۲ ساعت می باشند) ادامه دهید اما تعداد نمونه برداری را برای سلولهای کند رشد (یعنی سلولهای دارای PDT بیش از ۲۴ ساعت) تا هر ۲ روز یک بار کاهش دهید تا زمانیکه به فاز سکون برسند.

۹- با توجه به pH، محیط کشت را هر ۱، ۲ یا ۳ روز تعویض کنید.

۱۰- سلولهای یک فلاسک را در روزهای ۲، ۵، ۷ و ۱۰ رنگ کنید.

نکته) برای شمارش سلولها ممکن است از یک هموسیتومتر استفاده شود اما ممکن است استفاده از آن برای غلظت های سلولی کمتر مشکل باشد. اگر شما برای شمارش از هموسیتومتر استفاده می کنید، حجم تریپسین را تا ۰/۵mL کاهش داده و سلولها را با دقت و بدون اینکه کف تولید شود، با استفاده از یک سمپلر پخش کنید و سپس سلولها را روی هموسیتومتر انتقال دهید.

دستور کار۴-۱۳- منحنی رشد تک لایه در پلیت های چند خانه

طرح کلی

تعدادی پلیت های چند خانه با کشت هایی در سه غلظت مختلف سلولی تهیه کرده و تعداد سلولها در یک پلیت را هر روز شمارش کرده تا زمانیکه کشت به مرحله سکون می رسد.

مواد و وسایل

استریل یا تهیه شده به روش استریل:

کشت سلولی تک لایه HeLa-S3 یاVero، A549 در فلاسک $75cm^2$ در فاز تاخیر لگاریتمی........................ ۱

تریپسین ٪۰/۲۵ خام با EDTA۱۰mM .... ۵ mL

محیط کشت رشد، با NaHCO3 ۲۶mM .... ۳۰۰ mL

D-PBSA(برای شستشو و شمارش سلولی.......... ۵۰ mL

پلیت ۱۲ خانه.. ۱۰

غیر استریل:

جعبه پلاستیکی برای نگه داری پلیت ها

انکوباتور CO_2 یا مخزن CO_2 برای گازدهی به جعبه ها با ٪۵ CO_2

دستور کار

۱- سلولها را همانند واکشت معمولی تریپسینه کنید.

۲- سوسپانسیون سلولی را برای هر غلظت در ۲۵mL از محیط کشت تا 10^5 × ۱ cells/mL ، 10^4 × ۳ cells/mL و 10^4 × ۱ cells/mL رقیق کنید.

۳- سه عدد پلیت ۱۲ خانه را هر کدام با یک غلظت سلولی با ۲mL از سوسپانسیون سلولی 10^4 × ۱ cells/mL مناسب در هر کدام از ۴چاهک بالایی، ۲mL از 10^4 × ۳ cells/mL به هر یک از چاهک های ردیف دوم و ۲mL از 10^5 × ۱ cells/mL به هر یک از چاهک های ردیف سوم بذرافشانی کنید. سوسپانسیون سلولی را به آرامی از مرکز چاهک اضافه کرده به گونه ایکه در اطراف چاهک بچرخد و همچنین برای مخلوط کردن سلولها پلیت را تکان ندهید چون حرکت دورانی محیط کشت، باعث تجمع سلولها در وسط چاهک می شود.

۴- پلیت را در انکوباتور CO_2 مرطوب یا در جعبه ای که در آن محکم بسته شده و با ٪۵ CO_2 گازدهی شده قرار دهید.

۵- بعد از ۲۴ ساعت پلیت اول را از انکوباتور خارج کرده و سلولها را در سه چاهک در هر غلظت شمارش کنید.

a) محیط کشت را به طور کامل از سه چاهک حاوی سلول که باید شمارش شوند، خارج کنید.

b) ۰/۵ mL از تریپسین/EDTA به هر یک از سه چاهک اضافه کنید.

c) پلیت ها را به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه کنید.

d) ۰/۵ mL محیط کشت دارای سرم اضافه کرده، سلولها را در تریپسین/EDTA/محیط کشت پخش کرده و ۰/۴mL از سوسپانسیون سلولی را به ۱۹/۶ mL از D-PBSA اضافه کنید.

e) سلولها را توسط دستگاه شمارشگر الکترونیکی شمارش کنید.

۶- سلولهای موجود در چاهکهای باقیمانده در هر غلظت را رنگ کنید.

نکته) برای شمارش سلولها ممکن است از یک هموسیتومتر استفاده شود اما ممکن است استفاده از آن برای غلظت های سلولی کمتر مشکل باشد. اگر شما برای شمارش از هموسیتومتر استفاده می کنید، حجم تریپسین را تا $۰/۱$ mL کاهش داده و سلولها را با دقت و بدون اینکه کف تولید شود، با استفاده از یک سمپلر پخش کنید و سپس سلولها را روی هموسیتومتر انتقال دهید.

۷- همانند مرحله ۵ و ۶ نمونه بردای را ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد تکرار کنید.

۸- در صورتیکه pH محیط کشت کاهش یافته است، آنرا بعد از ۷۲ ساعت یا زودتر تعویض کنید.

۹- نمونه برداری روزانه را برای سلولهای سریع الرشد(یعنی سلولهایی که دارای یکPDT، ۱۴-۱۲ ساعت می باشند) ادامه دهید، اما تعداد نمونه برداری برای سلولهای کند رشد (یعنی سلولهای دارای PDT بیش از ۲۴ ساعت) را تا هر ۲ روز یک بارکاهش دهید تا زمانیکه به فاز سکون برسند.

۱۰- با توجه به pH، محیط کشت را هر ۱، ۲ یا ۳ روز تعویض کنید.

تجزیه و تحلیل منحنی های کشت تک لایه:

۱-تعداد سلولها را در هر چاهک، در هر میلی لیتر از محیط کشت و در هر سانتیمتر مربع از سطح رشد موجود در چاهک به صورت زیر حساب کنید:

a) **شمارش اولیه:** تعداد بدست آمده از شمارش الکترونیک یا هموسیتومتر، تعداد سلولها در هر میلی لیتر (cells/mL) از محلول تریپسینه می باشد.

b) **تعداد سلول در فلاسک یا چاهک:** زمانیکه ۱ mL تریپسین برای تریپسینه کردن استفاده می شود، شمارش اولیه با تعداد سلولها در فلاسک یا چاهک یکسان می باشد. اگر ۲ mL تریپسین استفاده شده باشد، تعداد سلولها دو برابر شده تا تعداد سلولها در فلاسک یا چاهک بدست آید. اگر $۰/۵$ mL تریپسین استفاده شده باشد، تعداد سلولهای شمارش شده را تقسیم بر ۲ کرده تا تعداد سلول در هر فلاسک یا چاهک بدست آید.

c) **تعداد سلول در هر میلی لیتر از محیط کشت (غلظت سلولی):** تعداد سلولهای هر چاهک یا فلاسک را بر حجم محیط کشت مورد استفاده در طی کشت تقسیم کنید.

d) **تعداد سلول در هر سانتیمتر مربع از سطح رشد(دانسیته سلولی):** تعداد سلولهای هر چاهک یا فلاسک را بر ناحیه سطحی چاهک یا فلاسک تقسیم کنید. چون در بین ظروف کشت شرکت های تولیدی مختلف تغییرات اندکی وجود دارد، بهتر است که ناحیه سطحی ظرف کشت مورد استفاده اندازه گیری شود. بعنوان یک راهنمای کلی، در یک پلیت ۲۴ خانه هر چاهک $۲cm^2$ و در یک پلیت ۱۲ خانه $۳/۸cm^2$ می باشد.

۲- منحنی دانسیته سلولی (سلول در سانتیمتر مربع) و غلظت سلولی(سلول در میلی لیتر) هر دو در مقیاس لگاریتمی بر حسب زمان به صورت مقیاسی خطی را رسم کنید.

۳-زمان تاخیر، PDT و دانسیته سکون را مشخص کنید.

۴-دانسیته مناسب شروع برای پاساژ روتین را مشخص کنید. در صورت نیاز، منحنی رشد را در غلظت های سلولی حد واسط تکرار کنید.

۵-منحنی رشد را در شرایط مختلف مقایسه کرده و سعی شود که داده ها تفسیر گردد.

۶- سلولهای رنگ شده در هر دانسیته را بررسی کرده تا:

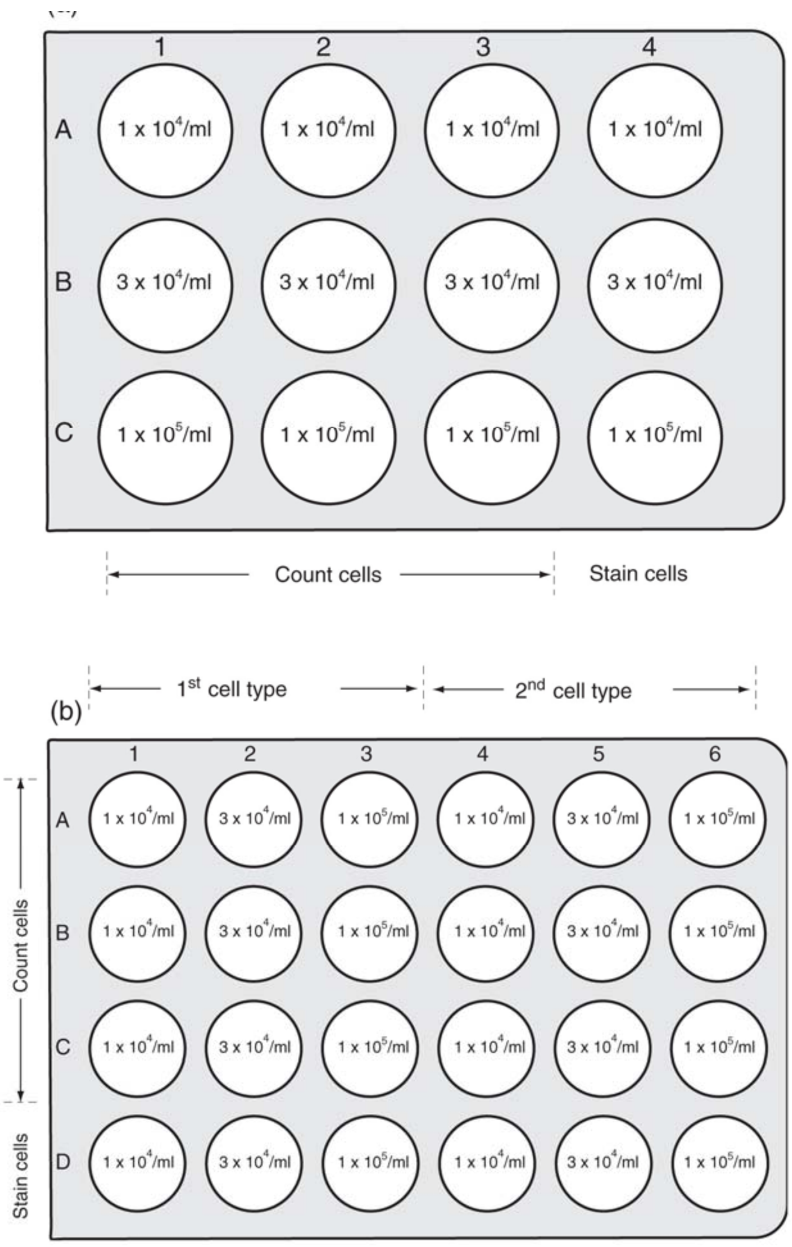
a) مشخص شود که آیا توزیع سلولی در فلاسک ها یا چاهک ها یکنواخت است و آیا سلولها در اطراف چاهک رشد می کنند.

b) تفاوت های مورفولوژی سلولی با افزایش دانسیته مشاهده شود.

c) بر همکنش سلول- سلول در سلولهای طبیعی و ترانسفورم شده مقایسه شود.

حجم محیط کشت، غلظت سلولی و دانسیته سلولی

وقتی که پلیت های چاهک دار استفاده می شوند و داده ها با فلاسک های کشت مقایسه می شوند یادآوری این نکته مهم است که حجم محیط کشت مورد استفاده در یک پلیت چاهک دار اغلب برای یک ناحیه سطحی معین بالاتر است و برای غلظت سلولی مشابه، دانسیته سلولی بیشتر می باشد. اگر ۲×۱۰^۴ cells/mL در ۵mL در یک فلاسک $۲۵cm^2$ بذرافشانی شود، دانسیته سلولی در هنگام بذرافشانی $۴۰۰۰cells/cm^2$ ($۲۵ \div ۵ \times ۲۰۰۰۰$) خواهد بود، در حالیکه اگر غلظت سلولی مشابه در ۲mL در یک پلیت ۱۲ خانه بذرافشانی شود، دانسیته سلولی $۱۰۵۰۰cells/cm^2$ ($۳/۸ \div ۲ \times ۲۰۰۰۰$) خواهد بود. این دانسیته دو برابر بیشتر از دانسیته سلولی فلاسک است و سلولها تقریباً یک روز زودتر به فاز سکون می رسند. برای مقایسه دقیق، نسبت محیط کشت به ناحیه سطحی کشت باید یکسان باشد و یک حجم $۰/۷۵$ برای ایجاد دانسیته سلولی مشابه در یک پلیت ۱۲ خانه همانند یک فلاسک $۲۵cm^2$ برای یک غلظت سلولی مشخص مورد نیاز می باشد. متاسفانه چنین حجم اندکی به دلیل شکل هلالی باعث توزیع سلولی ناهموار می شود و سلولها تمایل دارند در لبه های



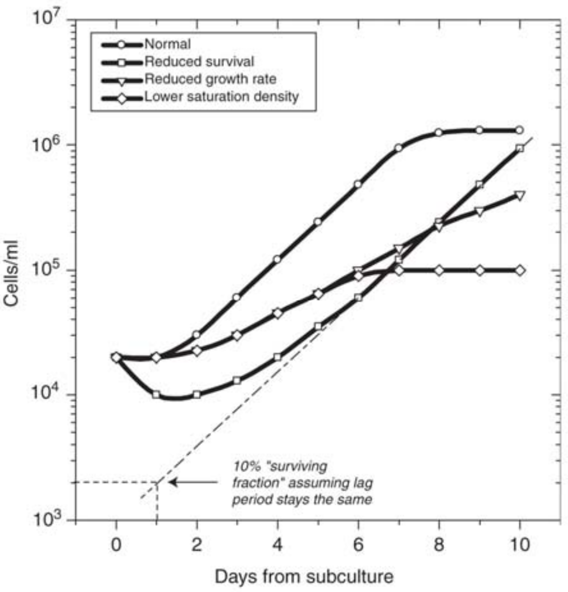
شکل ۵-۱۳: طرح پلیت های چاهک دار. (a) پلیت ۱۲ خانه، با سه غلظت مختلف سلولی و چاهک هایی که برای شمارش و رنگ آمیزی اختصاص یافته است و (b) پلیت ۲۴ خانه با یک متغیر اضافی که در این مورد نوع سلول می باشد.

چاهک ها متمرکز شوند. این مشکل زمانیکه چاهک ها کوچکتر می شوند افزایش می یابد زیرا اثر نسبی هلالی با کاهش قطر چاهک افزایش می یابد.

پلیت های چاهک دار برای مقایسه شرایط رشد، محیط های کشت، سرم ها یا فاکتورهای رشد یا سیتوکین های مختلف مناسب می باشند اما اگر یک منحنی رشد برای ایجاد شرایط نگهداری روتین استفاده شود، منحنی رشد باید در ظرف مشابه مورد استفاده برای واکشت روتین انجام شود (هر چند تفاوت بین یک فلاسک $۲۵cm^2$ و یک فلاسک $۷۵cm^2$ حداقل خواهد بود به شرط اینکه حجم کشت در سانتیمتر مربع یکسان باشد).

کشت های سوسپانسیون

همچنین می توان یک منحنی رشد را برای سلولهایی که به صورت شناور رشد می کنند، معمولاً بدون جایگزینی محیط کشت بدست آورد. چون نیازی به تریپسینه کردن نمی باشد می توان از یک ظرف چندین نمونه را به دست آورد.



شکل ۶-۱۳: تفسیر منحنی های رشد. تغییرات در شکل یک منحنی رشد را می توان به طرق مختلف تفسیر کرد اما برچسب ها در قسمت راهنمای این نمودارها نشان می دهد که معمولاً چه چیزی از این نمودارها استنباط می شود.

دستور کار۵-۱۳- منحنی رشد سلولهای سوسپانسیون

طرح کلی

تعدادی کشت در سه غلظت سلولی مختلف تهیه کرده و تعداد سلولها را هر روز شمارش کرده تا زمانیکه به مرحله سکون برسند.

مواد و وسایل

استریل یا تهیه شده به صورت استریل:

۱-کشت سلولی سوسپانسیون
۲-محیط کشت رشد ۱۰۰ mL
۳-D-PBSA (برای شمارش سلولی)
۴-پلیت های ۲۴ خانه

غیر استریل:

۱- جعبه پلاستیکی برای نگهداری پلیت ها
۲-انکوباتور CO_2 یا مخزن حاوی ٪۵ CO_2 برای گازدهی جعبه ها با ٪۵ CO_2

دستور کار

سوسپانسیون سلولی را در محیط کشت رشد تا غلظت ۱ × $۱۰^{۵}$ cells/mL، ۳ × $۱۰^{۴}$ cells/mL و ۱ × $۱۰^{۴}$ cells/mL در ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت برای هر غلظت رقیق کنید.

۱- بعد از اطمینان از اینکه سلولها به خوبی مخلوط شده و کاملاً از یکدیگر جدا شده اند، در فواصل زمانی مشخص ۰/۴mL از سوسپانسیون سلولی را از سه چاهک نمونه برداری کنید.

۲- نمونه ها را با استفاده شمارشگر سلولی الکترونیکی یا هموسیتومتر شمارش کنید.

۳- غلظت سلولی در هر نمونه را حساب کرده و آنرا در مقیاس لگاریتمی بر حسب زمان در مقیاس خطی همانند کشت تک لایه رسم کنید. برای کشت های سوسپانسیون، دانسیته سلولی استفاده نمی شود زیرا آنها به سطح نمی چسبند.

تغییرات: دو فلاسک ۷۵cm^2 را با ۲۰mL از سوسپانسیون سلولی در محیط کشت رشد برای هر غلظت سلولی بذرافشانی کرده و ۰/۴mL از کشت هر فلاسک را به صورت روزانه یا زمانی که نیاز است نمونه برداری کنید. قبل از نمونه برداری، کشت را به خوبی مخلوط کرده و فلاسک ها را برای حداقل زمان ممکن خارج از انکوباتور نگهداری کنید. کشت ها را در طی منحنی رشد، غذا دهی نکنید.

مراحل چرخه رشد

چرخه رشد را می توان به سه مرحله تقسیم کرد:

فاز تاخیر(The lag phase): این مرحله زمان بعد از واکشت و بذرافشانی مجدد می باشد که در طی آن شواهد کمی در مورد افزایش تعداد سلولها وجود دارد. این مرحله یک دورهٔ سازگاری می باشد که در طی آن، سلولها، اجزاء سطحی سلولی و ماتریکس خارج سلولی را که در زمان تریپسینه کردن از دست داده اند، جایگزین کرده، به بستر چسبیده و گسترش می یابند. در طی گسترش یافتن، اسکلت سلولی که یک جزء لازم برای فرایند پهن شدن می باشد مجدداً نمایان می شود. به دنبال سنتز DNA جدید و پروتئینهای ساختمانی، مقادیر آنزیمهایی مثل DNA پلیمراز افزایش می یابد. بعضی از محصولات سلولی خاص ممکن است ناپدید شده و تا توقف تکثیر سلولی تا یک دانسیته سلولی بالا ظاهر نخواهند شد.

فاز لگاریتمی(The log phase): این فاز، دوره افزایش نمایی در تعداد سلولها بعد از فاز تاخیر بوده و پس از یک یا دو دو برابر شدن جمعیت بعد از رسیدن به تراکم خاتمه می یابد. طول فاز لگاریتمی به دانسیته بذرافشانی، میزان رشد سلولها و

دانسیته ای که از تکثیر سلولی ممانعت می کند وابسته می باشد. در فاز لگاریتمی، نسبت رشد (growth fraction) بالا می باشد (معمولاً ٪۱۰۰-۹۰) و کشت در بالاترین میزان تقسیم سلولی خود می باشد. فاز لگاریتمی، زمان بهینه برای نمونه برداری است زیرا جمعیت در یکنواخت ترین حالت خود بوده و زیستایی بالا می باشد. هرچند که سلولها به طور تصادفی در چرخه سلولی توزیع می شوند، ممکن است در برخی از موارد لازم باشد که سلولها همزمان (synchronize) شوند.

فاز سکون (The plateau phase): در انتهای فاز لگاریتمی کشت ها متراکم می شوند – یعنی همهٔ سطح رشد در دسترس اشغال شده و تمام سلولها در تماس با سلولهای مجاور می باشند. بعد از رسیدن به حالت تراکم، میزان رشد کشت کاهش یافته و در بعضی موارد، بعد از یک یا دو دو برابر شدن جمعیت دیگر، تکثیر سلولی تقریباً به طور کامل متوقف می شود. در این مرحله کشت وارد فاز سکون یا ایستایی شده و نسبت رشد بین ٪۱۰ – ۰ کاهش می یابد. ممکن است سلولها کمتر متحرک بوده(less motile) ، بعضی فیبروبلاستها نسبت به یکدیگر متمایل(oriented) شده و تشکیل یک ردیف موازی تیپیکال از سلولها را می دهند. چین خوردگی غشای پلاسمایی کاهش یافته و هم سطح کمتری از بستر را اشغال کرده و هم سطح کمتری از خودشان را در معرض محیط کشت قرار می دهند. ممکن است یک افزایش نسبی در سنتز پروتئینهای ساختمانی اختصاصی ایجاد شده و ساختمان و بار سطح سلولی تغییر یابد.

توقف حرکت، چین خوردن غشایی و رشد بعد از تماس سلولها در حالت تراکم، ابتدا توسط Heaysman و Abercrombie در سال ۱۹۵۴ میلادی توصیف شد و به آن ممانعت تماسی (contact inbibition) اطلاق شد. امروزه مشخص شده است که کاهش رشد سلولهای طبیعی بعد از اینکه به حالت تراکم رسیدند، منحصراً به دلیل تماس نمی باشد، بلکه همچنین ممکن است به دلیل کاهش گسترش سلولی، ایجاد مهارکننده ها و فقدان مواد غذایی مخصوصاً فاکتورهای رشد در محیط کشت باشد. بنابراین به جای آن واژه محدودیت چگالی (density limitation) تکثیر سلولی استفاده می شود تا تصور اینکه تماس سلول مهمترین فاکتور محدود کننده است را برطرف کرده و واژه ممانعت تماسی بهتر است برای پدیده هایی که مستقیماً از تماس سلولی حاصل می شود (یعنی کاهش جنبش سلولی و چین خوردن غشای سلولی که در نتیجه تشکیل یک تک لایه دقیق و جهت گیری سلولها نسبت به یکدیگر می باشد) به کار رود.

کشت های سلولهای اپی تلیال و اندوتلیال طبیعی ساده بعد از اینکه به حالت تراکم رسیدند، رشد آنها متوقف شده و به صورت یک تک لایه باقی می مانند. هرچند با تعویض منظم محیط کشت، اغلب کشت ها به خوبی به تکثیر (هرچند به میزان کم) تا قبل از حالت تراکم ادامه خواهند داد که منجر به تشکیل لایه هایی از سلولها می شود. فیبروبلاست های ریه جنین انسان و فیبروبلاستهای پوست افراد بالغ که ممانعت تماسی حرکت را بیان می کنند، به تکثیر خود ادامه داده و بین لایه های سلولی، لایه هایی از کلاژن تولید کرده تا تحت شرایط بهینه چند لایه های سلولی متشکل از شش و یا تعداد بیشتری از سلولها را بتواند تشکیل دهند. هر چند باز هم این فیبروبلاستها آرایش موازی منظم را حفظ خواهند کرد. بنابراین واژه های "سکون"(plateau) و "ایستایی"(stationary) به طور دقیق درست نمی باشند و باید با احتیاط استفاده شوند.

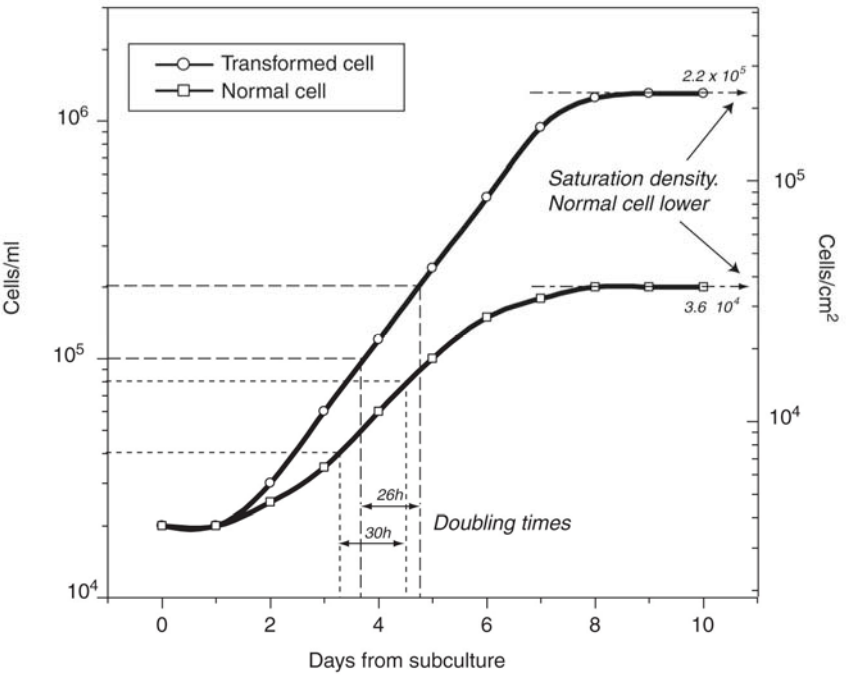
معمولاً کشت هایی که به صورت خود به خودی یا توسط ویروسها یا کارسینوژنهای شیمیایی ترانسفورم شده اند، در فاز سکون نسبت به همتاهای طبیعی خودشان به یک دانسیته سلولی بالاتری خواهند رسید. این دانسیته سلولی بالاتر با یک نسبت رشد بالاتر و با از دست دادن محدودیت دانسیته تکثیر سلولی همراه می باشد. اغلب این کشت ها برای رشد، مستقل از تکیه گاه می باشند یعنی می توانند به آسانی به حالت سوسپانسیون رشد کنند.

مشتقات چرخه رشد (Derivatives from the Growth Curve)

یک منحنی رشد حاصل از شمارش های سلولی در فواصل زمانی بعد از واکشت، ما را قادر به اندازه گیری تعدادی از پارامترهایی می سازد که تحت شرایط کشت مشخص، باید ویژگی اختصاصی رده سلولی باشد. اولین این پارامترها طول مدت زمان دوره تاخیر یا زمان تاخیر (lag time) می باشد که با خطی که از نقاط فاز نمایی کشیده شده تا غلظت بذرافشانی را قطع کند، مشخص می شود.

پارامتر دوم زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) می باشد- یعنی زمانی که کشت برای افزایش دو برابر در وسط فاز نمایی یا لگاریتمی رشد لازم دارد. این پارامتر نباید با زمان نسل یا زمان چرخه سلولی اشتباه شود که با اندازه گیری زمان مورد نیاز برای اینکه یک جمعیت سلولی از یک مرحله در چرخه سلولی به مرحله مشابه باز گردد، مشخص می شود.

آخرین سنجش ها حاصل از چرخه رشد سطح سکون (plateau level) و دانسیته اشباع می باشد. سطح سکون، غلظت سلولی (سلول/میلی لیتر از محیط کشت) در فاز سکون بوده و وابسته به نوع و تعداد دفعاتی است که محیط کشت تعویض می شود. دانسیته اشباع، دانسیته سلولها (تعداد سلولها در هر سانتیمتر مربع از سطح رشد) در فاز سکون می باشد. اندازگیری دقیق دانسیته اشباع و سطح سکون مشکل است زیرا در فاز سکون به آسانی یک حالت ثابت و پایدار ایجاد



شکل ۷-۱۳: دانسیته اشباع. ترانسفورماسیون باعث افزایش دانسیته اشباع سلولهای ترانسفورم شده در مقایسه با سلولهای طبیعی معادل می شود. این افزایش اغلب با PDT کوتاهتر همراه می باشد.

نمی شود. به طور ایده آل کشت ها باید غذا دهی شده تا از محدودیت مواد غذایی یا فاکتورهای رشد جلوگیری شود، اما یک روش معقول دیگر این است که سلولها روی یک ناحیه محدود مثل یک لامل یا چاهک فیلتردار به قطر ۱۵ میلی متر که در یک پتری دیش به قطر ۹۰ میلی لیتر که در آن ۲۰ میلی لیتر محیط کشت وجود داشته قرار گرفته و هر روز محیط کشت تعویض می شود. تحت این شرایط، محدودیت رشد ناشی از محیط کشت به حداقل رسیده و دانسیته سلولی بیشترین اثر را اعمال می کند. شمارش سلولی تحت این شرایط نسبت به شمارش در فاز سکون تحت شرایط مرسوم دقیق تر و کارآمدتر می باشد. توجه شود که واژهٔ "سکون" (plateau) به توقف کامل تکثیر سلول دلالت نمی کند بلکه در عوض به یک حالت یکنواخت دلالت داشته که در آن تقسیم سلولی با از دست رفتن سلولی در تعادل می باشد. در مورد سلولهای طبیعی، ممکن است بدون افزودن مجدد فاکتورهای رشد به محیط کشت، یک حالت یکنواخت امکان پذیر باشد. در این مورد سلولها، بذرافشانی شده و رشد می یابند و به سکون می رسند بدون اینکه محیط کشت تعویض شود. شرایط مورد استفاده برای رسیدن به فاز سکون باید به طور دقیق تعریف شده باشد.

کارایی پلیتینگ (plating efficiency)

تشکیل کلنی در دانسیته سلولی کم یا کارایی پلیتینگ، روشی است که برای تجزیه و تحلیل تکثیر سلولی و زنده بودن سلولها ترجیح داده می شود. این تکنیک، تفاوت میزان رشد در یک جمعیت را به صورت تغییرات موجود در میزان رشد (اندازه کلنی) و بقاء سلولی (تعداد کلنی) آشکار و مشخص می سازد. هر چند باید یادآوری شود که سلولها ممکن است مانند کلنی های منفرد در غلظتهای سلولی پایین به صورت متفاوت رشد کنند. در چنین شرایطی، حتی تحت شرایط ایده ال، سلولهای کمتری زنده مانده و تا کلنی شروع به تشکیل می کند همه بر همکنش های سلولی از دست می رود. ناهمگنی (هتروژنیسیتی) در مقادیر رشد کلونال منعکس کننده تفاوت ظرفیت تکثیر سلولی بین دودمان های درون یک جمعیت می باشد اما این تفاوتها وقتی که ارتباط سلولی امکان پذیر باشد در دانسیته های سلولی بالاتر لزوماً در یک تک لایه داری برهمکنش متقابل بیان نمی شود.

وقتی سلولها به صورت سوسپانسیون تک سلولی در دانسیته های سلولی پایین (۵۰-۲ سلول در سانتیمتر مربع) کشت می یابند، به صورت کلنی های مجزا رشد می کنند. تعداد این کلنی ها می تواند برای کارایی پلیتینگ استفاده شود.

$$\text{کارایی پلیتینگ} = \frac{\text{تعداد کلنی های تشکیل شده}}{\text{تعداد سلولهای بذرافشانی شده}} \times ۱۰۰$$

اگر بتوان ثابت کرد که هر کلنی از یک سلول منفرد رشد یافته است، می توان به جای واژه کارایی پلیتینگ از واژه کارایی کلونینگ استفاده کرد. اندازه گیری کارایی پلیتینگ با شمارش تعداد کلنی ها دارای یک اندازه خاص (معمولاً در حدود ۵۰ سلول) که از یک تلقیح پایین سلولی رشد یافته اند به دست می آید و این واژه نباید برای بازیافت (recovery) سلولهای چسبنده بعد از بذرافشانی در دانسیته های سلولی بالاتر (مثلاً $۱۰^۴ \times ۲$ سلول در هر سانتیمتر مربع) استفاده شود. بقاء در دانسیته های سلولی بالاتر به طور صحیح تر به صورت کارایی بذرافشانی (seeding efficiency) بیان می شود.

$$\text{کارایی بذرافشانی} = \frac{\text{تعداد سلولهای بازیافت شده}}{\text{تعداد سلولهای بذرافشانی شده}} \times ۱۰۰$$

کارایی بذرافشانی باید زمانیکه حداکثر تعداد سلولها متصل شده ولی قبل از شروع میتوز، اندازه گیری شود. تعیین این زمان مشکل می باشد چون ممکن است فاصله بین حداکثر اتصال سلولی و شروع میتوز، کاملاً محدود بوده و ممکن است وقایع با یکدیگر همپوشانی داشته باشند. هر چند هنوز هم یک اندازه گیری خام از بازیافت مثلاً در فریز کردن سلولی روتین یا کشت اولیه را فراهم می سازد.

دستور کار۶-۱۳- تعیین کارایی پلیتینگ

طرح کلی

سلولها را در دانسیته های سلولی پایین تر بذرافشانی کرده و تا زمانیکه کلنی ها تشکیل شوند انکوبه کنید؛ کلنی ها را رنگ کرده و شمارش کنید.

مواد

استریل:

محیط کشت رشد.. ۴۰۰ mL

تریپسین ۰/۲۵٪ خام .... ۱۰ mL

پتری دیش های ۶ سانتی متری ۲۰

لوله های آزمایش یا ظروف یونیورسال برای رقیق سازی ۲۰

غیر استریل:

هموسیتومتر یا شمارشگر سلولی الکترونیکی

فیکس کننده: متانول بدون آب(anhydrous) .. ۱۰۰ mL

D-PBSA .... ۲۰۰ mL

رنگ: کریستال ویوله .... ۱۰۰ mL

قیف فیلتراسیون و کاغذ فیلتر (برای بازیافت رنگ)

دستور کار:

۱- سلولها را تریپسینه کرده تا یک سوسپانسیون تک سلولی تولید شود.

۲- در حالیکه سلولها تریپسینه می شوند،

a) دیش ها را شماره گذاری کنید.

b) محیط کشت مورد نیاز برای مراحل رقیق سازی را اندازه گیری کنید. مرحله نهایی باید در غلظت کلونینگ (۲۰-۱۰۰۰cells/mL بر حسب کارایی پلیتینگ مورد نظر) انجام شود. محیط کشت باید بیش از مقدار مورد نیاز برای تهیه سه تکرار در رقت نهایی باشد.

۳- وقتی سلولها گرد شده و شروع به جدا شدن کردند،

a) محیط کشت حاوی سرم یا یک بازدارنده تریپسین را به سلولها اضافه کرده و سلولها را در آن پخش کنید.

b) سلولها را شمارش کنید؛

c) سلولها را رقیق کنید تا:

i) $۱۰^۴ \times ۲$ cells/mL برای دو فلاسک ۲۵cm^2 برای نگهداری روتین

ii) $۱۰^۳ \times ۲$ cells/mL بعنوان غلظت بالا برای رقت های بعدی

iii) پنج رقت دیگر از (ii) تا ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰ و ۱۰ cells/mL بدست آید.

۴- پتری دیش را با ۵mL محیط کشت حاوی سلولها در هر یک از پنج غلظت مرحله (iii) بذرافشانی کنید. دو پتری دیش ۶ cm را در $۱۰^۳ \times ۲$ cells/mL بذرافشانی کرده تا بعنوان شاهد استفاده شوند.

۵- فلاسک ها را با ۵٪ CO_2 گازدهی کرده و در انکوباتور قرار دهید.

۶- پتری دیش ها را در یک جعبه پلاستیکی شفاف گذاشته و آنها را در یک انکوباتور CO_2 ترجیحاً با دسترسی کم و مخصوص کلونینگ قرار دهید.

۷- دیش ها را تا زمانیکه کلنی ها با چشم غیرمسلح قابل مشاهده باشند انکوبه کنید(۳-۱ هفته).

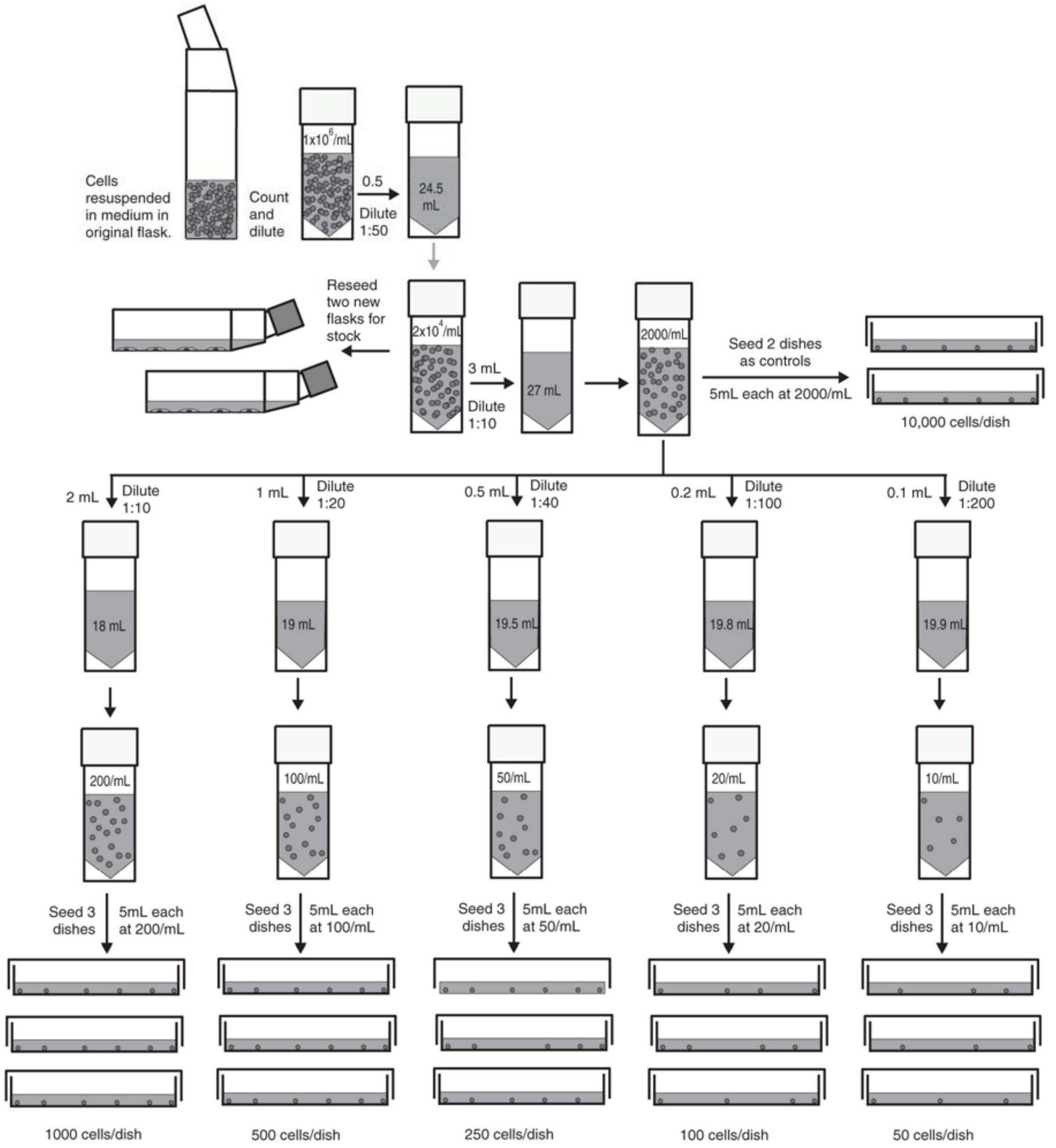
۸- سلولها را با کریستال ویوله رنگ کنید.

a) محیط کشت سلولها را خارج کنید؛

b) محیط کشت سلولها را با D-PBSA شستشو داده و مایع حاصل از شستشو را دور بریزید؛

c) D-PBSA ۵ mL تازه اضافه کرده و سپس با همزدن ملایم ۵ mL متانول اضافه کنید(از جدا شدن کلنی ها اجتناب شود).

d) D-PBSA: متانول با نسبت ۵۰:۵۰ را با ۵ mL متانول تازه جایگزین کرده و سلولها را به مدت ۱۰ دقیقه ثابت کنید.



شکل ۸-۱۳: رقیق کردن سلولها برای کلونینگ. رژیم پیشنهادی برای رقیق سازی سریال سلولها برای به دست آوردن دانسیته های بذرافشانی مناسب برای کلونینگ یک رده سلولی برای اولین بار یا به دست آوردن حالت خطی کارایی پلیتینگ برحسب غلظت بذرافشانی. سپس وقتی یک غلظت مناسب انتخاب شد، سلولها را می توان برای رسیدن به غلظت مناسب با مراحل کمتری رقیق کرد.

e) متانول را دور ریخته و ۲-۳ mL کریستال ویوله خالص برای هر پتری دیش ۶ cm اضافه کرده و مطمئن شوید که تمام سطح رشد پوشیده شده است؛

f) به مدت ۱۰ دقیقه سلولها را رنگ کنید؛

g) رنگ را خارج کرده و سپس بعد از فیلتر کردن آنرا به بطری استوک برگردانید.

h) دیش ها را با آب شستشو داده و اجازه دهید تا خشک شوند.

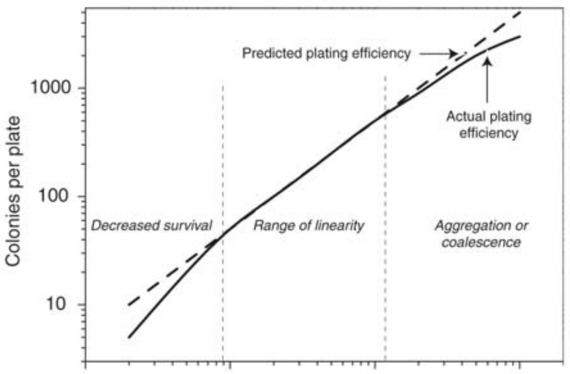
۹- تعداد کلنی ها به جز آنهایی که کمتر از ۵۰ سلول در هر کلنی دارند را در هر دیش شمارش کنید. استفاده از ذره بین شمارش کلنی ها را آسانتر می کند.

لازم است که یک آستانه ای را تعریف کرد که در بالاتر از آن کلنی ها شمارش شوند. اگر بیشتر کلنی ها بین صد تا چند هزارتا بودند، آستانه را ۵۰ سلول در هر کلنی تعیین کنید. هر چند اگر کلنی ها خیلی کوچک باشند(کمتر از ۱۰۰ سلول) آستانه را ۱۶ سلول در هر کلنی تعیین کنید. زیر ۱۶ سلول معادل

با ۴ تقسیم سلولی متوالی، در نظر گرفتن تکثیر سلولی پیوسته مشکل خواهد بود.

تجزیه و تحلیل تشکیل کلنی

کارایی پلیتینگ در هر دانسیته بذرافشانی را محاسبه کنید. باید کارایی پلیتینگ در تمام محدوده دانسیته های بذرافشانی ثابت باقی بماند(یعنی نمودار تعداد کلنی بر حسب تعداد سلولهای بذرافشانی شده باید خطی باشد). هر چند ممکن است بعضی از سلولها در دانسیته های بسیار پایین به خوبی پلیت نشوند و کارایی پلیتینگ کاهش خواهد یافت. این امر گاهی اوقات توسط استفاده از یک لایه تغذیه کنند به حداقل می رسد. اگر کارایی پلیتینگ در غلظت های بالاتر کاهش یافت، دلالت بر این دارد که سلولها تجمع یافته یا کلنی ها با هم ادغام شده اند. یک غلظت بذرافشانی که در محدوده خطی کارایی پلیتینگ واقع می شود، باید برای سنجشهای بعدی انتخاب شود. همچنین ممکن است توزیع اندازه کلنی ها [مثلاً برای سنجش قابلیت افزایش دهندگی رشد (growth- promting ability) یک محیط کشت یا سرم مورد آزمایش] با شمارش چشمی تعداد سلولها در هر کلنی و یا تخمین آن با اندازه گیری دانسیته تعیین شود. برای انجام این کار، بعد از فیکس و رنگ کردن کلنی ها با کریستال ویوله، جذب را توسط یک دانسیته سنج، اسکنر ژل یا شمارشگر اتوماتیک کلنی اندازه بگیرید.



شکل ۹-۱۳: خطی بودن کارایی پلیتینگ. در صورتی که کارایی پلیتینگ در محدوده وسیعی از غلظت های سلولی ثابت باقی بماند، نمودار خطی می باشد (خط منقطع)، در صورتی که اگر در دانسیته های پایین یا تراکم یا به هم پیوستگی در دانسیته های بالا، بقاء پایین باشد، کارایی پلیتینگ کاهش می یابد (خط توپر).

شمارش اتوماتیک کلنی

اگر کلنی ها از لحاظ شکل یکنواخت بوده و کاملاً مجزا باشند، ممکن است توسط یک شمارشگر اتوماتیک کلنی شمارش شوند، که پلیت را با یک دوربین CCD اسکن کرده و تصویر، تجزیه و تحلیل شده تا تعداد کلنی ها مشخص شود. یک مجزاگر برحسب اندازه (size discriminator) برحسب قطر متوسط کلنی ها، آنالیزی از اندازه کلنی ها می دهد اما این همیشه با تعداد سلولها متناسب نمی باشد، چون ممکن است سلولها در مرکز یک کلنی روی هم انباشته شوند.

هر چند این روش گران می باشد، اما این وسیله باعث صرفه جویی زیادی در زمان شده و می تواند شمارش کردن کلنی را بیشتر مورد توجه قرار دهد. هر چند این دستگاه قادر به شمارش کلنی هایی که بیش از حدود ٪۲۰ همپوشانی داشته یا آنهایی که دارای شکل نامنظم هستند، نمی باشد.

شاخص نشان دار کردن (Labeling index)

اگر یک کشت با $[^3H]-TdR$ نشاندار شود، سلولهایی که در حال ساخت DNA می باشند با ایزوتوپ ترکیب خواهند شد. درصد سلولهای نشاندار شده که توسط روش اتورادیوگرافی تعیین میشود، بعنوان شاخص نشاندار کردن (LI) شناخته می شود. اندازگیری LI بعد از یک دوره نشاندار کردن ۳۰ دقیقه ای با $[^3H]-TdR$ ، تفاوت زیادی را بین سلولهای در حال رشد نمایی(٪۲۰- ۱۰ = LI) و سلولهایی که در فاز سکون هستند (٪۱ ≈LI) نشان می دهد. چون در فاز ایستایی LI بسیار پایین است، طول زمان دوره نشاندار کردن با $[^3H]-TdR$ ممکن است تا ۲۴ ساعت افزایش یابد. با این طول دوره نشاندار کردن، می توان نشان داد که سلولهای طبیعی در مقایسه با سلولهای نئوپلاستیک، با $[^3H]-TdR$، LI پایین تری دارند.

دستور کار ۷-۱۳- شاخص نشاندار کردن با $[^3H]$- تیمیدین

طرح کلی

سلولها را تا یک دانسیته مناسب رشد دهید. سلولها را با $[^3H]$- تیمیدین به مدت ۳۰ دقیقه نشاندار کنید. سلولها را شستشو داده و ثابت کنید. پیش سازهای ترکیب نشده را از سلولها خارج کرده و اتورادیوگراف تهیه کنید.

مواد

استریل یا تهیه شده به روش استریل:

کشت سلولها

شکل ۱۰-۱۳: دستگاه شمارشگر اتوماتیک کلنی. شمارشگر اتوماتیک برای کلنی ها در آزمون های کارایی پلیتینگ و بقاء.

محیط کشت رشد
تریپسن ۰/۲۵٪ خام
D-PBSA
[^{3}H] –TdR – تیمیدین، (~۵۰μCi/mL) ۲ MBq/mL ، ۷۵ GBq/mmol (~۲ Ci/mmol)

نکته ایمنی) با [^{3}H]–تیمیدین با احتیاط کار شود چون رادیواکتیو و ژنوتوکسیک می باشد. برای استفاده از آن از دستورالعمل های موجود پیروی کنید.

پلیت (های) چند خانه حاوی لامل های ترمانوکس (Thermanox) ۱۳ میلیمتری

غیر استریل:

هموسیتومتر یا شمارشگر سلولی الکترونیکی
D-PBSA
استیک متانول(۱ قسمت اسید استیک گلاسیال در ۳ قسمت متانول) که در یخ سرد شده و تازه تهیه شده است
لامل های میکروسکوپی
Mountant (مثل DPX یا Permount)
تری کلرو استیک اسید(TCA)، ۰/۶ M که در یخ سرد شده است
آب دیونیزه
متانول

دستور کار

۱- کشت ها را در پلیت های۲۴ خانه حاوی لامل تا غلظت $۱۰^{۴}$ × ۲ سلول / میلی لیتر تا $۱۰^{۴}$ × ۵ سلول در میلی لیتر تهیه کنید.

۲- به سلولها اجازه دهید که چسبیده، شروع به تکثیر کرده (۷۲-۴۸ ساعت) و تا دانسیته سلولی مورد نظر رشد کنند.

۳- [^{3}H]–تیمیدین را به محیط کشت اضافه کنید، ۱۰۰KBq/mL(~۵ μCi/mL) و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه کنید.

نکته) بعضی از محیط های کشت مثل Ham's F10 و Ham's F12 حاوی تیمیدین می باشند. دراین موارد، غلظت تیمیدین رادیواکتیو باید افزایش یافته تا فعالیت ویژه (specific activity) مشابهی را در محیط کشت ایجاد کند.

۴- محیط کشت نشاندار شده را خارج کرده و آنرا در یک ظرف مخصوص پس مانده های رادیواکتیو بریزید.

۵- لامل را سه بار با D-PBSA شستشو دهید. در هر شستشو لامل را از ته چاهک بلند کرده (اما از آن خارج نکنید) تا امکان برطرف شدن ایزوتوپ از زیر آن وجود داشته باشد.

۶- D-PBSA: استیک متانول را به نسبت ۱:۱ به مقدار ۱mL در هر چاهک اضافه کرده و سپس بلافاصله آنرا خارج کنید.

۷- ۱mL استیک متانول با دمای ۴°C به هر چاهک اضافه کرده و کشت را به مدت ۱۰ دقیقه در همان حالت قرار دهید.

۸- لامل ها را بیرون آورده و آنها را در مقابل پنکه بخشکانید.

۹- لامل را روی یک لام میکروسکوپی به صورتی که قسمت دارای سلول به سمت بالا باشد قرار دهید.

۱۰- اجازه دهید که mountant به مدت یک شب خشک شود.

۱۱- لام ها را در یک دیش رنگ آمیزی حاوی ۰/۶ M TCA در دمای ۴°C قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه در همان حالت بگذارید. در طی استخراج TCA را دوبار جایگزین کرده و به این وسیله پیش سازهای ترکیب نشده را خارج سازید.

۱۲- لامها را ابتدا با آب دیونیزه و سپس با متانول شستشو داده و سپس لامها را بخشکانید.

۱۳- یک اتورادیوگراف تهیه کنید.

۱۴- وقتی که اتورادیوگراف برای زمان مناسب در معرض آن قرار گرفت(معمولاً ۲-۱ هفته)، آنرا ظاهر کرده، رنگ نموده و در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰× مشاهده کنید.

۱۵- درصد سلولهای نشاندار شده را محاسبه کنید. برای پوشش دادن یک ناحیه مشخص از الگوی اسکن کردن که در شکل۱۱-۱۳ شرح داده شده است پیروی کنید.

نسبت رشد

اگر سلولها با [^{3}H]–تیمیدین برای دوره های زمانی مختلف تا ۴۸ ساعت نشاندار شوند، نمودار LI بر حسب زمان، در طی چند ساعت اولیه به سرعت افزایش یافته و سپس به یک شیب بسیار کم، تقریباً یک شیب صاف تبدیل می شود(شکل۱۲-۱۳). سطح صاف خوانده شده بر روی محور

عمودی، نسبت رشد کشت یعنی نسبت سلولهای در چرخه، در زمان نشاندار کردن می باشد.

دستور کار ۸-۱۳- تعیین نسبت رشد

طرح کلی

کشت را به طور پیوسته به مدت ۴۸ ساعت نشاندار کرده و در فواصل زمانی برای تهیه اتورادیوگرافی نمونه برداری کنید.

دستور کار

مطابق دستور کار قبلی عمل شود با این تفاوت که در مرحله ۳، انکوباسیون باید به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۰ دقیقه، ۱، ۲، ۴، ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شود.

تجزیه و تحلیل: با استفاده از الگوی اسکنینگ دستور کار قبلی تعداد سلولهای نشاندار شده را نسبت به درصد تعداد کل سلولها حساب کنید. نمودار LI را بر حسب زمان رسم کنید.

نکته) وقتی می توان اتورادیوگرافهای با ^3H را تهیه کرد که سلولها به صورت تک لایه باقی بمانند. اگر سلولها به صورت چند لایه باشند، باید آنها را بعد از نشاندار کردن تریپسینه کرد و باید توسط تکنیک drop یا توسط cytocentrifugation لامها را تهیه کرد چون انرژی نشر-β (β-emmision) ^3H برای نفوذ به لایه های چند سلولی (overlying layers) بسیار پایین است.

همچنین می توان LI را با نشاندار کردن سلولها با BUdR که با DNA ترکیب می شود، تعیین کرد. سپس این اثر را می توان با رنگ آمیزی ایمنی (immunostaining) با یک آنتی بادی ضد BUdR مشخص کرد. معمولاً نتایج این روش با نتایج حاصل از استفاده از [^3H] -تیمیدین سازگار می باشد.

شاخص میتوزی (mitotic index)

شاخص میتوزی نسبت یا درصد سلولهایی می باشد که درحال میتوز می باشند و با شمارش میتوزها در کشت رنگ آمیزی شده نسبت به جمعیت کل سلولها تعیین می شود. الگوی اسکنیک باید مشابه با شمارش هسته های نشاندار باشد.

شاخص تقسیم (division Index)

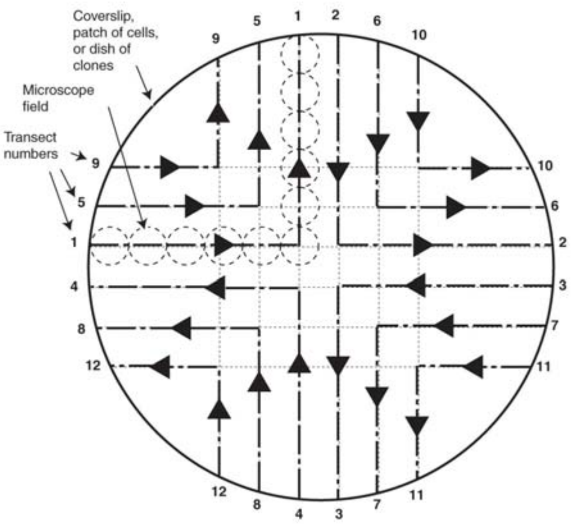
تعدادی از آنتی بادیها، از قبیل Ki67 یا anti-PCNA قادر به رنگ کردن سلولها در چرخه تقسیم می باشند. این آنتی بادیها بر ضد پروتئین هایی که در طی چرخه سلولی بیان شده اما در سلولهای در حال استراحت بیان نمی شوند، به کار می روند. بعضی از آنتی بادیها مستقیماً برضد DNA پلیمراز می باشند اما اپی تویهای دیگر ناشناخته می باشند. سلولها توسط ایمنوفلورنس یا ایمنوپراکسیداز رنگ می شوند و نسبت سلولهای رنگ شده به صورت سیتولوژیکی یا با فلوسیتومتری تعیین می شود. این روش یک شاخص بالاتری را نسبت به شمارش میتوزی یا نشاندار کردن DNA می دهد، چون سلولها در تمام چرخه رنگ می شوند. همچنین این روش تشخیص مفیدی از نسبت رشد را فراهم می سازد.

زمان چرخه سلولی

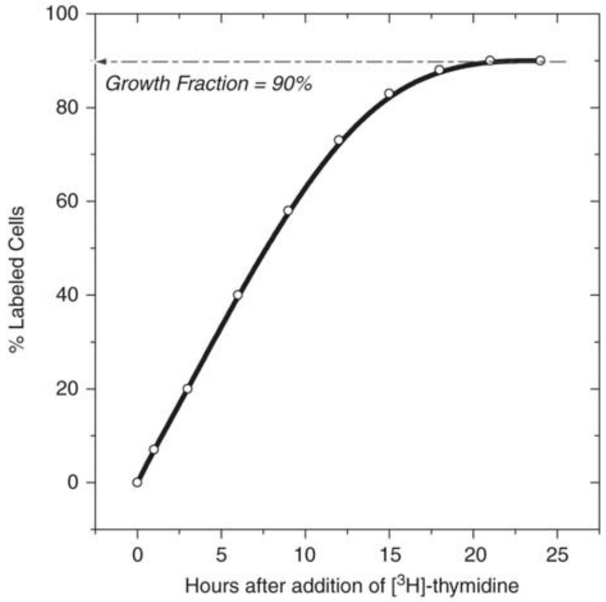
برای تعیین طول چرخه سلولی (زمان نسل) و فازهای تشکیل دهنده آن، سلولها به طور پیوسته با BUdR نشاندار شده و سپس در فواصل زمانی مختلف بعد از نشاندار شدن، توسط میکروسکوپ ایمنوفلورسنس یا فلوسیتومتری آشکار می شوند. همچنین برای فلوسیتومتری، سلولها با پروپیدیوم یدید رنگ شده و ترکیب BUdR با DNA تجزیه و تحلیل شده تا پیشرفت سلولها در چرخه دنبال شود.

مهاجرت سلولی (cell migration)

سلولهای کشت شده مخصوصاً فیبروبلاست ها، متحرک بوده و قادرند بر حسب دانسیته سلولی و وجود محرک هایی مثل فاکتورهای رشد، مسافتهای طولانی را در سر تا سر بستر طی کنند. میزان حرکت با مشاهده چین خوردگی غشای سلول با ویدئو تاخیر زمانی(time-lapse video) ثابت می شود. تعیین میزان حرکت مشکل است اما میزان مهاجرت سلولی را می توان با تجزیه و تحلیل دقیق توالی های ویدئو تاخیر زمانی یا با تجزیه و تحلیل تصویری مسیرهای حرکت ایجاد شده توسط فاگوسیتوز سلولی در دیش هایی که با طلای کلوئیدی پوشش داده شده اند، بدست آورد. همچنین می توان مهاجرت را با تغییر مکان سلولها از طریق یک غشای متخلخل، مانند سنجش شیمیوتاکسی در Boyden chamber یا سنجش تهاجم در یک چاهک فیلتردار سنجید.



شکل ۱۱-۱۳: اسکن کردن لام ها یا دیش ها. الگوی اسکن کردن برای آنالیز نمونه های سیتولوژیکی بر روی لام یا دیش. هر دایره نقطه چین نمایانگر یک میدان دید میکروسکوپ بوده و دایره بزرگ نشان دهنده اندازه نمونه می باشد (مثلاً یک لامل، دیش کشت یا چاهک یا یک نقطه از سلولها روی یک لام). خطوط راهنما را می توان با یک ماژیک دارای سر نایلون دارای جوهر روشن و شفاف کشید.



شکل ۱۲-۱۳: نسبت رشد. برای تعیین نسبت رشد، سلولها به طور پیوسته با$[^3H]$- تیمیدین نشاندار شده و درصد سلولهای نشاندار شده در فواصل زمانی با اتورادیوگرافی مشخص می شود.

فصل چهاردهم

سیتوتوکسیسیتی

زیستایی، توکسیسیتی و بقاء

وقتی یک سلول از محیط طبیعی خود در *in vivo* خارج شده و در آزمایشگاه کشت داده می شود، مسئله زیستایی سلولی از اهمیت خاصی برخوردار است. بسیاری از آزمایشاتی که در *in vitro* انجام می شود به منظور تعیین پتانسیل سیتوتوکسیسیتی ترکیبات مورد بررسی بوده و یا چون ترکیبات بعنوان مواد دارویی یا بهداشتی استفاده می شوند و باید نشان داده شود که غیر سمی می باشند و یا به دلیل اینکه این ترکیبات بعنوان عوامل ضد سرطان طراحی شده اند و ممکن است سیتوتوکسیسیتی برای فعالیت آنها ضروری باشد، انجام می شوند.

داروهای جدید، مواد آرایشی، افزودنیهای غذایی و غیره قبل از اینکه مورد استفاده عمومی قرار گیرند، آزمایشات سیتوتوکسیسیتی وسیعی را طی می کنند. این آزمایشات اغلب شامل تعداد زیادی آزمایشات حیوانی می باشد. هر چند که انجام این آزمایشات برروی حیوانات دارای محدودیتها و قوانین خاص خود می باشد. بنابراین فشارهای بیشتری هم از لحاظ انسانی و هم اقتصادی وجود دارد که حداقل قسمتی از آزمایشات سیتوتوکسیسیتی در *in vitro* انجام شود. با معرفی رده های سلولی اختصاصی و کشت های ارگانوتایپیک دارای برهمکنش متقابل (interactive organotypic) و استفاده پیوسته از کشت های پایدار در زمان طولانی، آزمایشات *in vitro* را بعنوان یک پیشنهاد قابل قبول مطرح ساخته است.

سمیت در *in vivo* یک پدیده پیچیده می باشد که ممکن است به صورت آسیب سلولی مستقیم مثل یک داروی ضد سرطان سیتوتوکسیک، تأثیرات فیزیولوژیک از قبیل انتقال غشایی در کلیه یا نوروتوکسیسیتی در مغز، تأثیرات التهابی هم در محل مصرف و هم در جایگاهای دیگر و تأثیرات سیستمیک دیگر باشد. در حال حاضر بررسی اثرات سیستمیک و فیزیولوژیکی در*in vitro* مشکل می باشد، بنابراین اغلب سنجش ها، تأثیرات را در سطح سلولی یا سیتوتوکسیسیتی مشخص می سازند. تعاریف سیتوتوکسیسیتی بر حسب ماهیت مطالعه و اینکه آیا سلولها کشته شده اند و یا فقط متابولیسم آنها تغییر یافته است، متفاوت می باشد. در حالیکه لازم است که یک عامل ضد سرطان سلولها را بکشد، اثبات فقدان سیتوتوکسیسیتی مواد دارویی دیگر ممکن است به تجزیه و تحلیل دقیق تری از هدف های اختصاصی از قبیل تغییر سیستمهای پیام رسانی سلولی یا برهمکنش سلولی از قبیل آنچه که ممکن است منجر به یک پاسخ التهابی یا آلرژیک شود، نیاز داشته باشد.

محدودیت های *in vitro*

لازم است که هر نوع اندازه گیری*in vitro* را بتوان از لحاظ پاسخ *in vivo* سلولها تفسیر کرد یا حداقل تفاوتهایی را که بین اندازه گیریهای *in vivo* و*in vitro* وجود دارد به طور واضح مشخص نمود.

فارماکوکنتیک (pharmacokinetics): اندازه گیری سمیت در *in vitro* عموماً یک پدیده سلولی می باشد. بعنوان مثال فارماکوکنتیک های پیچیده مجاورت دارویی در *in vitro* و بین آزمایشات *in vitro* و *in vivo* بسیار مشکل می باشد، چون معمولاً تفاوت های زیادی در زمان مجاورت و غلظت دارو، میزان تغییر غلظت، متابولیسم، نفوذ بافتی، تصفیه (clearance) و دفع وجود دارد. هر چند امکان شبیه سازی این پارامترها مثل استفاده از اسفروئیدهای توموری چند سلولی برای نفوذ دارو یا تزریق طولانی برای شبیه سازی اثرات غلظت و زمان ($C\times T$)وجود دارد، اغلب مطالعات برروی یک پاسخ سلولی مستقیم تمرکز داشته که باعث سادگی و امکان تکرار پذیری آن می شود.

متابولیسم: بسیاری از مواد غیر سمی بعد از متابولیزه شدن توسط کبد سمی می گردند. همچنین بسیاری از موادی که در *in vitro* سمی می باشند، ممکن است توسط آنزیمهای کبد غیر سمی شوند. برای اینکه آزمایش در شرایط *in vitro* بتواند بعنوان جایگزین دیگری برای آزمایشات حیوانی مورد پذیرش قرار گیرد، باید ثابت شود که سموم بالقوه در *in vitro* به فرم مشابه با فرمی که در *in vivo* هستند به سلولها می رسند. اثبات این مطلب ممکن است نیازمند پردازش بیشتر توسط نمونه های آنزیمی میکروزومی کبدی خالص سازی شده، کشت توأم با سلولهای کبدی فعال شده یا تغییرات ژنتیکی سلولهای هدف با وارد کردن ژنهای آنزیمهای متابولیزه کننده تحت کنترل یک پروموتور قابل تنظیم باشد.

بافت و پاسخ های سیستمیک: ماهیت پاسخ هم باید همچنین به دقت مورد توجه قرار گیرد. یک پاسخ سمی در *in vitro* ممکن است با تغییرات در بقاء سلولی یا متابولیسم اندازه گیری شود، در حالیکه ممکن است مسئله عمده در *in vivo* ، یک پاسخ بافتی (مثلاً یک واکنش التهابی، فیبروزیس، نارسایی کلیوی) یا یک پاسخ سیستمیک (مثل تب، اتساع عروق) باشد. برای اینکه آزمایش در*in vitro* موثرتر باشد، باید مدلهایی از این پاسخ ها، شاید با استفاده از کشتهای ارگانوتایپیک از چندین نوع مختلف سلولی که در محیط هورمونی مناسب نگهداری شده ایجاد شود.

نباید فرض شود که بافت پیچیده و حتی واکنشهای سیستمیک نمی تواند در *in vitro* شبیه سازی شود. ممکن است سنجش پاسخ های التهابی، اختلالات تراتوژنیک و اختلالات عصبی در *in vitro* با یک فهم صحیح تر از برهمکنش های سلول– سلول و فعل و انفعال هورمونهای اندوکراین با فاکتورهای موضعی پاراکراین و اتوکراین، عملی باشد.

ماهیت سنجش

انتخاب سنجش به عامل مورد مطالعه، ماهیت پاسخ و سلول هدف خاص وابسته خواهد بود. سنجش را می توان به پنج دسته عمده تقسیم کرد:

۱) **زیستایی (viability):** یک پاسخ سریع یا کوتاه مدت، از قبیل یک تغییر در نفوذپذیری غشاء یا اختلال در یک مسیر متابولیک خاص مرتبط با تکثیر یا بقاء سلول

۲) **بقاء (survival):** حفظ طولانی مدت ظرفیت خودنوسازی (self-renewal) (۱۰-۵ نسل یا بیشتر).

۳)**متابولیک (metabolic):** سنجشهایی با مدت زمان متوسط که معمولاً براساس میکروتیتراسیون است که می تواند یک پاسخ متابولیک (مثل فعالیت دهیدروژناز، سنتز RNA، DNA یا پروتئین) را در زمان مجاورت یا مدتی بعد از آن اندازه گیری کند. اندازه گیری بعد از دو یا سه دو برابر شدن جمعیت به احتمال بیشتر منعکس کننده پتانسیل رشد سلولی بوده و ممکن است با بقاء مرتبط باشد.

۴)**ترانسفورماسیون:** بقاء در یک حالت تغییر یافته [مثلاً یک حالت بیان کننده موتاسیون(های) ژنتیکی، تغییرات در کنترل رشد یا ترانسفورماسیون بدخیم].

۵)**تحریک(irritancy)** : یک پاسخ مشابه با التهاب یا آلرژی در *in vivo* ، به گونه ایکه ایجاد مدل التهاب در *in vitro* مشکل می باشد، اما ممکن است با بررسی آزادسازی سیتوکین در کشت های ارگانوتایپیک امکان سنجش وجود داشته باشد.

زیستایی (viability)

سنجش های زیستایی برای اندازه گیری سلولهای زیست پذیر(viable) به دنبال یک روش آسیب زای بالقوه، از قبیل جداسازی اولیه، جداسازی سلولی یا فریز کردن و ذوب کردن استفاده می شوند. اغلب آزمایشهای زیستایی براساس یک نقص در تمامیت غشاء می باشد که با جذب یک رنگ که سلول در حالت طبیعی نسبت به آن نفوذ ناپذیر است (مثل تریپان بلو، اریتروزین یا نفتالن بلک) یا آزاد سازی یک رنگ که به طور طبیعی توسط سلولهای زنده جذب و نگهداری می شود (مثل دی استیل فلورسین یا قرمز خنثی) مشخص می شود. هر چند این اثر فوری بوده و همیشه بقاء نهایی را پیش بینی نمی کند. بعلاوه جلوگیری از ورود رنگ منجر به تخمین بیش از حد زیستایی می شود مثلاً ٪۹۰ از سلولهای ذوب شده از نیتروژن مایع ممکن است تریپان بلو را به داخل راه ندهند اما ثابت شده است که فقط ٪۶۰ از این سلولها قادرند بعد از ۲۴ ساعت بچسبند.

دستور کار۱-۱۴- برآورد زیستایی با استفاده از تریپان بلو

قاعده کلی

سلولهای زنده نسبت به نفتالن بلک، تریپان بلو و تعدادی از رنگ های دیگر نفوذناپذیرند.

طرح کلی

یک سوسپانسیون سلولی را با رنگ مخلوط کرده و آنرا با میکروسکوپ با بزرگنمایی کم مشاهده کنید.

مواد:

استریل یا تهیه شده به صورت آسپتیک:

سلولهای مورد آزمایش

محیط کشت رشد مناسب نوع سلول ۲۰mL

تریپسین ٪۰/۲۵ .... ۵mL

D-PBSA ۱۰mL

غیراستریل:

هموسیتومتر

رنگ زیستایی (مثل تریپان بلو ٪۰/۴ یا نفتالن بلک ٪۱ در D-PBSA یا HBSS)

پی پت پاستور

میکروسکوپ

tally counter

دستورکار:

۱-با ترپیسنه کردن یا با سانتریفوژ کردن و تعلیق مجدد، یک سوسپانسیون سلولی با غلظت بالا (تقریباً $۱۰^{۶}$ سلول در میلی لیتر) تهیه کنید.

۲-یک لام هموسیتومتر تمیز را برداشته و لامل را جای خود قرار دهید.

۳-یک قطره از سوسپانسیون سلولی را با یک قطره (تریپان بلو) یا چهار قطره (نفتالن بلک) از رنگ مخلوط کنید.

۴-محفظه شمارش هموسیتومتر را پر کنید.

۵-لام را به مدت ۲-۱ دقیقه به همان حالت قرار دهید(سلولها را برای مدت زمان بیشتری نگه ندارید در غیر اینصورت سلولهای زنده خواهند مرد و رنگ را جذب خواهند کرد).

۶-لام را با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ×۱۰ مشاهده کنید.

۷-تعداد کل سلولها و تعداد سلولهای رنگ شده را شمارش کنید.

۸-هموسیتومتر را شستشو داده و آنرا به جعبه خود باز گردانید.

تجزیه و تحلیل: درصد سلولهای رنگ نشده را محاسبه کنید. این تعداد درصد زیستایی در این روش می باشد.

دستور کار۲-۱۴- تعیین میزان زیستایی توسط جذب رنگ

قاعده کلی

سلولهای زنده دی استیل فلورسین را جذب کرده و آنرا به فلورسین هیدرولیز می کنند که غشاء سلولی سلولهای زنده نسبت به آن نفوذ ناپذیر می باشد. سلولهای زنده دارای فلورسانس سبز می باشند و سلولهای مرده فاقد آن می باشند. ممکن است سلولهای غیره زنده با پروپیدیوم یدید (propidium iodide) رنگ شده و دارای فلورسانس قرمز شوند. زیستایی به صورت درصد سلولهایی است که دارای فلورسانس سبز می باشند. این روش ممکن است برای آنالیز CCD یا فلوسیتومتری به کار رود.

طرح کلی

یک سوسپانسیون سلولی را در مخلوطی از پروپیدیوم یدید و دی استیل فلورسین رنگ کرده و سلولها را با میکروسکوپ فلورسانس یا فلوسیتومتری بررسی کنید.

مواد

استریل یا تهیه شده به روش آسپتیک:

سوسپانسیون تک سلولی

فلورسین دی استات ۱۰µg/mL در HBSS

پروپیدیوم یدید ۵۰۰µg/mL

غیراستریل:

میکروسکوپ فلورسانس

فیلترهای:

فلورسین: تهییج ۴۵۰/۵۹۰nm، نشر LP۵۱۵nm

پروپیدیوم یدید: تهییج ۴۸۸nm، نشر ۶۱۵nm

دستور کار

۱- سوسپانسیون سلولی را مطابق دستور کار قبلی اما در محیط کشت فاقد فنل رد تهیه کنید.

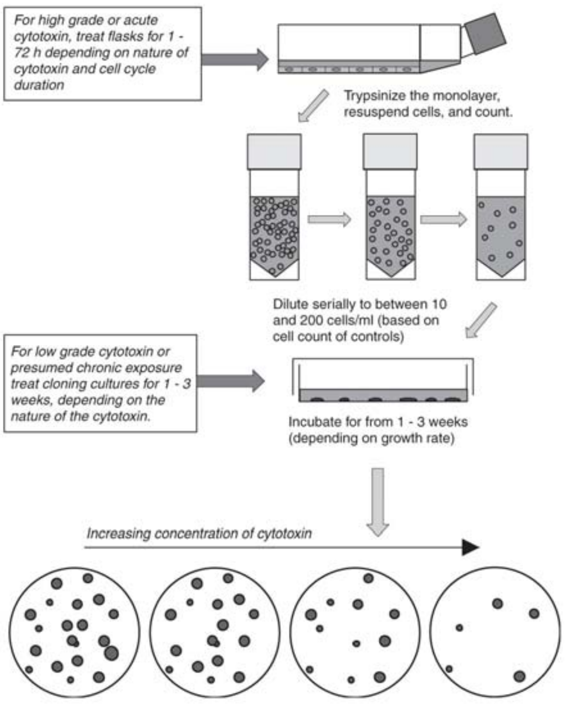
۲- مخلوط رنگ فلورسنت را به نسبت ۱:۱۰ تا رسیدن به غلظت ۱µg/mL از دی استیل فلورسین و ۵۰µg/mL از پروپیدیوم یدید اضافه کنید.

۳- سلولها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C انکوبه کنید.

۴- یک قطره از سلولها را روی یک لام میکروسکوپی قرار داده، یک لامل روی آن گذاشته و سلولها را توسط میکروسکوپ فلورسانس بررسی کنید.

تجزیه و تحلیل: سلولهایی که دارای فلورسانس سبز می باشند، زنده بوده در حالیکه آنهائیکه دارای فلورسانس قرمز می باشند، سلولهای غیر زنده می باشند. ممکن است زیستایی به صورت درصد سلولهایی که دارای فلورسانس قرمز هستند نسبت به تعداد کل سلولها بیان شود. همچنین سوسپانسیون سلولی رنگ شده می تواند توسط فلوسیتومتری تجزیه وتحلیل شود.

جذب قرمز خنثی: سلولهای زنده، قرمز خنثی ۴۰µg/mL موجود در محیط کشت را جذب کرده و آنرا در لیزوزومهای خود محبوس می کنند. هرچند قرمز خنثی توسط سلولهای غیر زنده جذب نمی شود. جذب قرمز خنثی توسط فیکس



شکل ۱-۱۴: آزمون کلونوژنیک برای سلولهای تک لایه. سلولها، تریپسینه، شمارش و رقیق می گردند. ماده مورد آزمایش را می توان قبل از تریپسینه کردن یا بعد از کلونینگ اضافه کرد. وقتی که کلنی ها به اندازه قابل قبول برای شمارش توسط چشم رسیدند اما قبل از این که با هم همپوشانی پیدا کنند، کلنی ها ثابت شده و رنگ آمیزی می شوند.

کردن سلولها در فرمالدئید و حل کردن رنگ در استیک اتانول اندازگیری شده و امکان خوانده شدن پلیت در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰nm را ممکن می سازد. قرمز خنثی تمایل به ته نشین شدن دارد، بنابراین محیط کشت دارای رنگ معمولاً به مدت یک شب انکوبه شده و قبل از مصرف سانتریفوژ می شود. این سنجش، تعداد کل سلولها را نمی سنجد بلکه کاهش در میزان جذب مربوط به از دست رفتن سلولهای زنده را نشان می دهد و به آسانی قابل مکانیزه شدن می باشد.

بقاء (survival)

در حالیکه آزمایشات کوتاه مدت (short term) راحت و معمولاً سریع بوده و انجام آنها آسان است این آزمایشات فقط سلولهایی که مرده اند (یعنی نفوذ پذیر می باشند) را در زمان سنجش آشکار می کنند. هر چند اغلب، سلولهایی که در معرض اثرات سمی (مثل پرتوتابی و داروهای ضد تومور) قرار گرفته اند یک اثر را چند ساعت یا حتی چند روز بعد نشان می دهند. ماهیت آزمایشات مورد نیاز برای اندازه گیری زیستایی در این موارد لزوماً متفاوت نمی باشد چون بعد از زمانیکه سنجش انجام می شود، ممکن است سلولهای مرده ناپدید شده باشند. بنابراین آزمایشات بلند مدت (long term) به جای اینکه برای سمیت کوتاه مدت استفاده شود برای اثبات بقاء استفاده می شود که ممکن است برگشت پذیر باشد. کارایی پلیتینگ، بقاء را با تعیین ظرفیت تکثیری برای چندین نسل سلولی می سنجد مشروط بر اینکه سلولها با یک راندمان بالا کشت شوند تا بتوان کلنی ها را بعنوان نماینده کل جمعیت سلولی در نظر گرفت. هرچند یک راندمان بالاتر از ۱۰٪ معمولاً قابل قبول است اما بهینه نمی باشد.

دستور کار ۳-۱۴ - آزمون کلونوژنیک برای سلولهای چسبنده

طرح کلی

سلولها را به مدت ۲۴ ساعت با عامل مورد آزمایش در یک محدوده ای از غلظت تیمار کنید. سلولها را تریپیسینه کرده، آنها را در یک دانسیته سلولی پایین بذرافشانی کرده به مدت ۳-۱ هفته انکوبه کنید. سلولها را رنگ آمیزی کرده و تعداد کلنی ها را شمارش کنید.

مواد

استریل:

محیط کشت رشد

D-PBSA

تریپسین ۰/۲۵٪ خام

ترکیب مورد آزمایش با غلظت ۱۰ برابر غلظت حداکثر مورد استفاده که در محیط کشت فاقد سرم حل شده باشد. pH و اسمولالیتی محلول آزمایش را چک کرده و در صورت نیاز تنظیم کنید.

فلاسک های ۲۵cm^2

پتری دیش های ۶ یا ۹cm که علامت گذاری شده اند.

غیر استریل:

D-PBSA

متانول

کریستال ویوله ۱٪

هموسیتومتر یا دستگاه شمارشگر سلولی الکترونیکی

دستورکار:

۱-یک سری از کشتها را در فلاسک های ۲۵cm^2 ،برای هر یک از شش عامل غلظت و سه کنترل تهیه کنید. سلولها را با غلظت $۱۰^۴$ × ۵ سلول در میلی لیتر در ۴/۵mL از محیط کشت رشد بذرافشانی کرده و وقتی که کشت ها وارد

مرحله فاز لگاریتمی می شوند آنها را به مدت ۴۸ ساعت انکوبه کنید.

۲-یک رقت سریال از ترکیب تهیه کنید به گونه ای که ۲mL از غلظت ده برابر از هر یک از غلظت های نهایی مورد نیاز تهیه شود.

a)اگر یک ترکیب را برای اولین بار آزمایش می کنید، از رقت های ۵ برابر در محدوده logs ۵-۳ استفاده کنید.

b)اگر قادر به پیش بینی غلظت سمی تقریبی می باشید، می توانید یک دامنه محدودتر را در محدوده ۱۰ یا ۲۰ (over one or two decades) انتخاب کنید.

۳-هر غلظت را با افزودن ۰/۵mL از محلول ده برابر غلظت به هر یک از سه فلاسک برای هر رقت به نسبت ۱:۱۰ رقیق کرده، با محیط کشت کنترل (هیچ ترکیبی به آن اضافه نشده است) شروع کرده و از پائین ترین غلظت به سمت بالاترین غلظت به پیش بروید.

۴-فلاسک ها را به انکوباتور باز گردانید.

۵-اگر ترکیب دارای فعالیت کند بوده یا نسبتاً برگشت پذیر است، مرحله ۳ را دو بار تکرار کنید، کشت را به مدت ۳ روز در معرض ماده قرار داده، محیط کشت و ترکیب را هر روز با تعویض محیط کشت جایگزین کنید. در مورد ترکیبات سریع الاثر (fast-acting) یک روز مجاورت کافی خواهد بود.

۶-محیط کشت را از هر گروه سه تایی به ترتیب خارج کرده (از پایین ترین غلظت ترکیب به طرف بالاترین غلظت کار شود) و سلولها را تریپسینه کنید.

۷-سلولها را رقیق کرده و در دانسیته مورد نیاز برای رشد کلونال درون پتری دیش ها بذرافشانی کنید. همه کشت ها به میزان مساوی با کنترل رقیق شوند. از فلاسک هایی که با بالاترین غلظت در تماس بوده اند به سمت کمترین غلظت و سپس با شاهد کار شود.

۸-کشت ها را انکوبه کرده تا کلنی ها تشکیل شوند.

۹-کشت ها را در متانول مطلق فیکس کرده و آنها را به مدت ۱۰ دقیقه در کریستال ویوله ۱٪ رنگ کنید.

۱۰- دیش ها را با آب معمولی شستشو داده، خشکانده و آنها را در حالت وارونه قرار داده تا خشک شوند.

۱۱-کلنی های با بیش از ۵۰ سلول (بیش از ۵۰ نسل) را شمارش کنید.

تجزیه و تحلیل منحنی بقاء

۱۲- کارایی پلیتینگ را در هر غلظت دارو محاسبه کنید.

۱۳- کارایی پلیتینگ نسبی (کارایی پلیتینگ در هر غلظت نسبت به شاهد) را محاسبه کنید. این مقدار نسبت بقاء می باشد.

۱۴- نسبت بقاء را در مقیاس لگاریتمی بر حسب غلظت در مقیاس خطی یا لگاریتمی در محدوده غلظت مورد استفاده رسم کنید.

۱۵- IC_{50} یا IC_{90} که غلظتی از ترکیب می باشد که به ترتیب باعث ٪۵۰ یا ٪۹۰ ممانعت از تشکیل کلنی می شود را مشخص کنید. چون نمودار به صورت نیمه لگاریتمی می باشد، IC_{90} مناسب تر است چون به احتمال بیشتری بر روی قسمت خطی نمودار واقع می شود، در حالیکه IC_{50} تمایل دارد روی پیچ (knee) نمودار قرار گیرد که یک ارزش کمتر پایدار را می دهد.

۱۶- منحنی را از لحاظ تفاوت در حساسیت تجزیه و تحلیل کنید:

a) شیب منحنی و طول پیچ: یک شیب کم عمق تر و یا پیچ طولانی تر به معنی حساسیت کمتر می باشد؛ یک شیب عمیق تر و یا پیچ کوتاهتر به معنی حساسیت بیشتر می باشد. هم طول پیچ و هم شیب بر روی IC_{50} وIC_{90} موثر می باشند، هر چند در IC_{90} یک تفاوت مهمتری مشاهده می شود.

b) نسبت مقاوم: نسبت سلولهای مقاوم با پهن شدگی در انتهای زیرین نمودار نشان داده می شود.

c) مقاومت کل با عدم وجود هرگونه شیبی بر روی نمودار مشخص می شود.

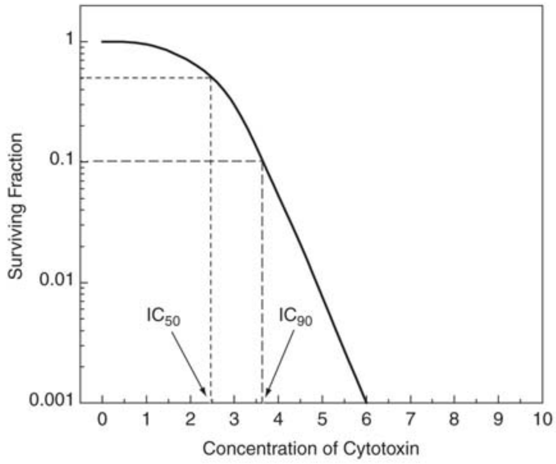
d) سطح زیر منحنی: نمودارهای پیچیده بقاء ممکن است با محاسبه سطح زیر نمودار با هم مقایسه شوند، اما این کار از لحاظ ریاضی معتبر نبوده و در شرایط اضطراری استفاده می شود.

پارامترهای متغیر در آزمون بقاء

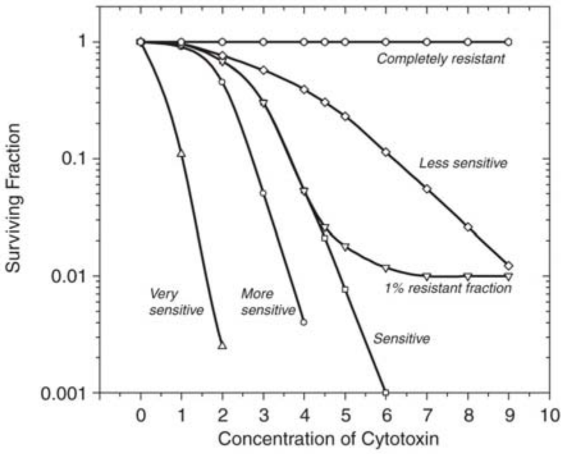
غلظت ماده: برای اولین بار دامنه وسیعی از غلظتها به صورت افزایش لگاریتمی(مثلاً 1×10^{-6} M ، 1×10^{-5} M ، 1×10^{-4} M ، 1×10^{-3} M و شاهد) و برای تلاشهای بعدی دامنه محدودتری از غلظت ها (لگاریتمی یا خطی) بر اساس نتایج اولین دامنه باید استفاده شود.

غلظت های ماده بدون تغییر: بعضی از شرایطی که آزمایش می شوند مثل کیفیت محیط کشت، آب یا پلاستیک نامحلول (insoluble plastic) را نمی توان به آسانی تغییر داد. در این موارد، می توان غلظت های سرم را تغییر داد. چون ممکن است سرم یک اثر پوشاننده برروی آثار سمی مختصر داشته باشد، ممکن است یک اثر فقط در غلظت محدود سرم مشاهده شود.

مدت مجاورت با ماده: بعضی از عوامل به سرعت عمل کرده، در حالیکه بقیه آهسته تر عمل می کنند. بعنوان مثال مجاورت با اشعه یونیزان برای رسیدن به دوز مورد نیاز فقط به چند دقیقه زمان نیاز دارد، در حالیکه آزمایش بعضی از داروهای



شکل ۲-۱۴: منحنی بقاء. نمودار نیمه لگاریتمی نسبت بقاء سلولها (کلنی های حاصل از سلولهای مورد آزمایش/ کلنی های حاصل از سلولهای شاهد) برحسب غلظت سیتوتوکسین. معمولاً منحنی دارای یک خمیدگی می باشد و IC_{90} بر روی محدوده خطی منحنی واقع می شود. IC_{50} بر روی خمیدگی واقع شده و دارای ارزش ثابت کمتری می باشد.



شکل ۳-۱۴: تفسیر منحنی های بقاء. نمودار نیمه لگاریتمی بقاء سلولی بر حسب غلظت سیتوتوکسین. شیب منحنی با افزایش حساسیت افزایش یافته و با کاهش حساسیت، کاهش می یابد تا زمانی که برای مقاومت کامل، کاملاً صاف می شود.

آنتی متابولیک وابسته به چرخه(cycle – dependent) ممکن است برای رسیدن به یک تأثیر قابل اندازه گیری به چند روز زمان نیاز داشته باشد.

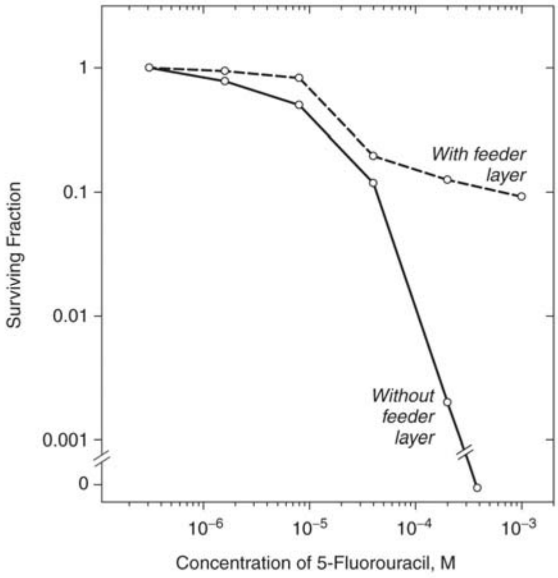
طول مدت مجاورت (T) و غلظت دارو (C) وابسته به هم هستند، هر چند T × C همیشه ثابت نمی باشد. مجاورت طولانی می تواند حساسیت را بیش از مقدار پیش بینی شده C × T افزایش دهد که در نتیجه اثر چرخه سلولی و آسیب تجمعی (Cumulative) می باشد.

زمان مجاورت با ماده: وقتی که ماده محلول بوده و انتظار می رود که سمی باشد باید مطابق دستور کار ۱۴-۳- عمل شود، اما وقتی کیفیت ماده ناشناخته می باشد، تحریک یا فقط یک اثر جزئی (مثلاً ٪۲۰ ممانعت به جای چندین برابر) مورد انتظار است، ماده مورد بررسی ممکن است به جای زمان قبل از انکوباسیون در طی رشد کلونال ترکیب شود. تایید سمیت مورد انتظار- مثلاً برای یک داروی سیتوتوکسیک، به یک آزمون محافظه کارانه (conservative) با حداقل تماس دارو در مقایسه با آنکه در *in vivo* قبل از کلونینگ به کار می رود، نیاز دارد. تایید عدم سمیت مثلاً برای آب شیر یا یک ماده دارویی غیرسمی به یک آزمون دقیق تر با تماس طولانی مدت در طی کلونینگ نیازمند می باشد.

دانسیته سلولی در طی مجاورت: دانسیته سلولی در طی مجاورت با یک عامل می تواند پاسخ سلولها و عامل را تغییر دهد. بعنوان مثال سلولهای HeLa در دانسیته های سلولی بالا نسبت به عامل آلکیله کننده mustine حساسیت کمتری دارند. برای مشخص کردن اثرات دانسیته سلولی باید آنرا در مرحله پیش از انکوباسیون در طی مجاورت با دارو تغییر داد.

دانسیته سلولی در طی کلونینگ: در غلظت های بالای یک عامل سمی ممکن است تعداد کلنی ها کاهش یابد اما می توان این اثر را با بذرافشانی سلولهای بیشتر جبران کرد به گونه ایکه تقریباً تعداد مشابهی از کلنی ها در هر غلظت تشکیل شود. این روش خطر دانسیته کلونال پایین که برروی بقاء تاثیر گذار است را مرتفع کرده و اعتبار آماری آنرا افزایش می دهد اما مستعد به خطا می باشد چون سلولها در غلظت های بالاتر دارو با یک غلظت سلولی بالاتر کشت شده که این فاکتور ممکن است برروی بقاء موثر باشد. ترجیح داده می شود که سلولها را برروی یک لایه تغذیه کننده که دانسیته سلولی (5×10^3 cells/cm^2) آن بسیار بیشتر از سلولهای کلونینگ می باشد، کشت داد. این مرحله اطمینان می دهد که دانسیته سلولی بدون توجه به بقاء کلونال یکنواخت بوده، که کمتر به دانسیته سلولی کل مربوط است. توجه شود که کلونینگ بر روی یک لایه تغذیه کننده می تواند گاهی اوقات سلولهای مقاومی که بدون لایه تغذیه کننده آشکار نیستند را آشکار کند.

اندازه کلنی: بعضی از عوامل سیتواستاتیک بوده (یعنی از تکثیر سلولی ممانعت می کنند) اما سیتوتوکسیک نمی باشند و



شکل ۴-۱۴: تأثیر لایه تغذیه کننده بر روی نسبت مقاوم. سلولهای گلیومای انسانی در حضور (خط منقطع) و در غیاب (خط توپر) یک لایه تغذیه کننده بعد از تیمار با غلظت های مختلف ۵- فلوروواورسیل کشت داده می شوند. یک نسبت مقاوم ٪۱۰ در غلظت M $۱×۱۰^{-۴}$ دارو فقط در حضور یک لایه تغذیه کننده آشکار می باشد. در غیاب لایه تغذیه کننده، تعداد کم کلنی هایی که نسبت مقاوم را تشکیل می دهند، قادر نیستند که به تنهایی زنده بمانند.

در طی تماس پیوسته ممکن است اندازه کلنی ها را کاهش داده بدون اینکه تعداد کلنی ها کاهش یابد. در این موارد، اندازه کلنی ها باید توسط دانسیته سنجی (densitometry)، شمارش کردن اتوماتیک کلنی ها یا با شمارش کردن تعداد سلولها در هر کلنی مشخص شود. برای شمارش کردن کلنی ها، تعداد آستانه سلولها در هر کلنی (مثلاً ۵۰ عدد) کاملاً اختیاری بوده و فرض می شود که اغلب کلنی ها بیشتر از این تعداد می باشند. باید به کلنی ها تا جایی که کاملاً بزرگ شوند (بیش از $۱×۱۰^{۳}$) فرصت رشد داد. برای اندازه گیری کلنی ها، کشت ها را قبل از اینکه میزان رشد کلنی های بزرگتر کاهش یابد، رنگ کرده و همه کلنی ها را حساب کنید.

حلالها (Solvents): بعضی از عوامل مورد آزمایش در محیط های کشت آبی دارای حلالیت کمی بوده و ممکن است لازم باشد تا از یک حلال آلی برای حل کردن آنها استفاده شود. اتانول، پروپیلن گلایکول و دی متیل سولفوکساید برای این منظور استفاده می شوند اما امکان دارد که خودشان برای سلولها سمی باشند. بنابراین شما باید برای بدست آوردن یک محلول، حداقل غلظت حلال را استفاده کنید. ماده ممکن است در یک غلظت بالا در مثلاً اتانول ٪۱۰۰ ساخته شود، سپس باید آنرا به تدریج با BSS رقیق کرده و در نهایت در محیط کشت رقیق می شود. غلظت نهایی حلال باید کمتر از ٪۰/۵ بوده و باید یک شاهد حلال هم استفاده شود (یعنی یک شاهد با غلظت نهایی مشابه حلال اما بدون ماده مورد آزمایش).

زمانیکه از حلال های آلی در ظروف پلاستیکی یا لاستیکی استفاده می کنید مراقب باشید. بهتر است برای حلالهای رقیق نشده از شیشه استفاده شود و فقط زمانیکه غلظت حلال کمتر از ٪۱۰ می باشد از پلاستیک استفاده شود. در حالیکه کارایی پلیتینگ یکی از بهترین روشهای آزمایش کردن میزان بقاء سلولی می باشد، باید فقط زمانی که کارایی کلونینگ برای کلنی های تشکیل شده به اندازه کافی بالا بوده تا نماینده کل جمعیت سلولی باشد، استفاده گردد. در شرایط آرمانی این به این معنا می باشد که شاهدها باید در بازده ٪۱۰۰ کشت شوند. هر چند در عمل این امر به ندرت امکان پذیر است و کارایی پلیتینگ شاهد از ٪۲۰ یا کمتر اغلب قابل قبول می باشد.

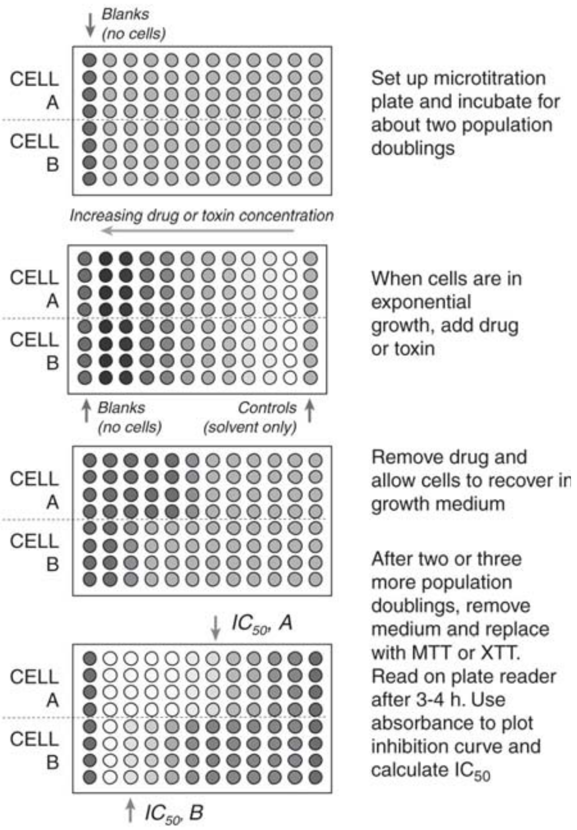
سنجش های بر پایه تکثیر سلولی

شمارش سلولی در کشت پس از چند روز می تواند برای تعیین تاثیر ترکیبات مختلف بر روی تکثیر سلولی استفاده شود اما حداقل در مراحل اولیه آزمایش، به یک نمودار رشد کامل نیاز می باشد چون تعداد سلولها (cell counts) در یک تک مرحله زمانی می تواند مبهم باشد.

تجزیه و تحلیل منحنی رشد با استفاده از شمارش سلولی، فقط در مورد تعداد نسبتاً کمی نمونه قابل اجرا می باشد، چون در یک غربالگری بزرگ طاقت فرسا می شود. در مواردی که تعداد زیادی نمونه وجود دارد، یک مرحله خاص زمانی (single point in time) مثلاً تعداد سلولها سه روز پس از مجاورت – می تواند استفاده شود، اما هر اثر مهمی باید توسط یک نمودار رشد کامل در طی چرخه رشد یا توسط یک آزمون دیگر از قبیل یک نمودار بقاء توسط آزمون کلونوژنیک یا آزمون MTT تکمیل شود.

آزمونهای سیتوتوکسیسیتی متابولیک

آزمایشات کارایی پلیتینگ و تجزیه و تحلیل آنها پر زحمت و وقت گیر می باشد، بخصوص زمانیکه تعداد نمونه ها زیاد بوده و مدت هر آزمایش ممکن است ۴-۲ هفته باشد. بعلاوه بعضی از رده های سلولی بخصوص سلولهای طبیعی تازه جداسازی شده دارای کارایی پلیتینگ کم می باشند، بنابراین تعدادی روشهای دیگر برای سنجش سلولها در دانسیته های بالاتر (مثلاً در پلیت های میکروتیتراسیون) بوجود آمده است. هر چند هیچ یک از این آزمایشات، مستقیماً بقاء را اندازه گیری نمی کنند. به جای آن افزایش ویژه در تعداد سلولها (یعنی



شکل ۵-۱۴: آزمون میکروتیتراسیون. دو رده سلولی مختلف در معرض محدوده ای از غلظت های یک داروی مشابه قرار گرفته اند و سپس قبل از تعیین بقاء توسط واکنش MTT، اجازه ترمیم به آنها داده شده است. اولین ستون سمت چپ هیچ سلولی نداشته و می تواند به عنوان یک بلانک برای تنظیم دستگاه پلیت ریدر استفاده شود. این آرایش زمانی که از plate sealer استفاده شود و وقتی که همه چاهک ها مشابه باشند قابل اجرا می باشد. هر چند در هنگام استفاده از درپوش، خطر"edge effect" شاید به دلیل تبخیر وجود دارد و بهتر است که ستون های آخر سمت چپ و راست بلانک (یعنی فقط حاوی محیط کشت) باشند. بعضی از افراد ستون های بالایی و پائینی را هم بلانک می گیرند.

سلولها نمی باشد و بنابراین هر گونه مشاهدات استثنایی و جدید باید توسط آزمون های بقاء کلونوژنیک تایید شود.

آزمون های میکروتیتراسیون

با ورود پلیت های چند خانه، تحول بزرگی در نمونه برداریهای تکراری (replicate sampling) در کشت سلولی ایجاد شد. این پلیت ها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه بوده، می توانند از کیفیت نوری خوبی برخوردار باشند و امکان کار کردن به صورت اتوماتیک با آنها وجود دارد. متداولترین پلیت های میکروتیتراسیون ۹۶ خانه می باشد که هر چاهک دارایmm^2 ۳۲-۲۸ سطح رشد بوده و دارای ظرفیت ۰/۲mL – ۰/۱ محیط کشت و $۱۰^۵$ × ۱ سلول می باشد. میکروتیتراسیون امکان این را فراهم کرده که به طور همزمان با تعداد زیادی نمونه اما با سلولهای نسبتاً کم از هر نمونه کار شود. با این روش کل جمعیت در معرض عامل قرار گرفته و سپس زیستایی معمولاً با اندازه گیری یک پارامتر متابولیک از قبیل غلظت ATP یا NADH/NADPH تعیین می شود. در این زمینه تعدادی کیت از شرکت Promega موجود می باشد.

نقطه پایانی (end point) یک سنجش میکروتیتراسیون معمولاً برآورد تعداد سلولها می باشد. در حالیکه این نتایج می تواند به صورت مستقیم با شمارش سلولها یا با روشهای غیر مستقیم از قبیل ترکیب شدن ایزوتوپ (incorporation isotope) و زیستایی سلولی که توسط احیاء MTT اندازه گیری می شود انجام پذیرد. MTT یک رنگ تترازولیوم زرد رنگ و محلول در آب می باشد که فقط توسط سلولهای زنده به یک محصول فورمازن(formazan) ارغوانی نامحلول در محلولهای آبی احیا می شود. هر چند، بعضی از عوامل می توانند برروی احیاء MTT موثر باشند. مشخص شده است که آزمون MTT که در دستور کار ۴-۱۴ شرح داده شده است، نتایج مشابهی با یک آزمون کلونوژنیک استاندارد می دهد. این روش، استفاده از میکروتیتراسیون را درسنجش داروهای ضد سرطان شرح می دهد اما می توان با تغییرات جزئی از آن برای هر نوع سنجش سیتوتوکسیسیتی دیگر استفاده کرد.

دستور کار۴-۱۴- آزمون سیتوتوکسیسیتی براساس MTT

اصل

سلولها در مرحله نمایی رشد در معرض یک داروی سیتوتوکسیک قرار می گیرند. مدت زمان مجاورت معمولاً حداکثر زمان مورد نیاز برای ایجاد حداکثر آسیب سلولی

نمودار رشد)، افزایش مقدار کل پروتئین یا DNA یا توانایی برای ساختن پروتئین یا DNA تعیین می شود. در اینگونه موارد، بقاء به صورت حفظ توانایی تکثیری یا متابولیکی توسط کل جمعیت سلولی، مدتی پس از برداشت اثر سمی، تعریف می شود. هر چند چنین آزمونهایی قادر به تمایز میان کاهش فعالیت متابولیکی یا تکثیر سلول و یک تعداد کاهش یافته از

می باشد، اما همچنین تحت تأثیر پایداری دارو هم قرار می گیرد. بعد از خارج کردن دارو، به سلولها اجازه داده می شود برای دو تا سه زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT_S) تکثیر حاصل کرده تا تفاوت میان سلولهایی که زنده مانده و قادر به تکثیر هستند و آنهایی که زنده مانده اما نمی توانند تکثیر شوند، مشخص شود. سپس تعداد سلولهای زنده به طور غیرمستقیم با احیاء رنگ MTT مشخص می شود. میزان MTT– فورمازن تولید شده را می توان با حل کردن MTT– فورمازن در یک حلال مناسب، با اسپکتروفتومتری تعیین کرد.

طرح

کشت های تک لایه در پلیت های میکروتیتراسیون را در یک دامنه از غلظت های دارو انکوبه کنید. دارو را خارج کرده و پلیت را به مدت دو تا سه PDT_S غذا دهی کنید، سپس پلیت ها را مجدداً غذا دهی کرده و MTT – فورمازن نامحلول در آب را در DMSO حل کرده، یک بافر برای تنظیم pH نهایی افزوده و جذب آنرا با دستگاه الیزا ریدر بخوانید.

مواد

استریل:

محیط کشت رشد

تریپسین ۰/۲۵٪ + ۱mM EDTA در HBSS

MTT: 3 – (4 , 5– dimethylthiazol – 2 - yl)– 2 , 5– diphenyl-tetrazolium bromide، ۵۰ mg/mL که با فیلتراسیون استریل شده است

بافرگلیسین Sorensen (گلیسین ۰/۱ M، Nacl ۰/۱M که با سود ۱ M در ۱۰/۵ pH تنظیم شده است)

پلیت های میکروتیتراسیون

سرسمپلر، ترجیحاً در یک جعبه سرسمپلر قابل اتوکلاو

پتری دیش های ۵cm و ۹cm (که مخصوص کشت بافت نمی باشد)

لوله یا ظروف یونیورسال ۳۰mL و ۱۰۰mL

غیراستریل:

جعبه پلاستیکی (پلی استیرن شفاف برای نگهداری پلیت ها)

سمپلر چند کاناله

دی متیل سولفوکساید (DMSO)

توزیع کننده DMSO (اختیاری)

دستگاه الیزا پلیت ریدر

plate carrier برای سانتریفوژ (برای سلولهایی که بصورت سوسپانسیون رشد می کنند)

دستور کار

کشت دادن سلولها:

۱- یک کشت تک لایه که در زیر حد تراکم می باشد را تریپسینه کرده و سلولها را در محیط کشت حاوی سرم جمع آوری کنید.

۲- سوسپانسیون را سانتریفوژ کرده (۵ دقیقه در ۲۰۰g) تا سلولها ته نشین شوند. سلولها را مجدداً در محیط کشت رشد به حالت تعلیق در آورده و آنها را شمارش کنید.

۳- بر حسب میزان رشد رده سلولی، سلولها را تا ۲/۵ – ۵۰ × ۱۰^{3} سلول در میلی لیتر رقیق کرده و ۲۰mL از سوسپانسیون سلولی را برای هر پلیت میکروتیتراسیون در نظر بگیرید.

۴- سوسپانسیون سلولی را به یک پتری دیش ۹cm انتقال داده و با یک سمپلر چند کاناله، ۲۰۰mL از سوسپانسیون را به هر کدام از چاهکهای ۱۰ستون مرکزی یک پلیت ۹۶ خانه ته صاف اضافه کنید (۸۰ چاهک در هر پلیت)، از ستون دوم شروع کرده و با ستون ۱۱ خاتمه دهید و ۰/۵ – ۱۰ × ۱۰^{3} سلول در هر چاهک بریزید.

۵- ۲۰۰mL از محیط کشت رشد را به ۸ چاهک در ستونهای ۱ و ۱۲ اضافه کنید. ستون ۱ باید بعنوان بلانک برای الیزا ریدر استفاده شود، ستون ۱۲ به تأمین رطوبت ستون ۱۱ کمک کرده و "edge- effect" را به حداقل می رساند.

۶- پلیت ها را دریک جعبه پلاستیکی و در یک اتمسفر مرطوب در دمای ۳۷°C به مدت ۳-۱ روز انکوبه کرده، به طوریکه در زمان افزودن دارو، سلولها در مرحله نمایی رشد باشند.

۷- برای سلولهای غیر چسبنده، سوسپانسیون را در محیط کشت رشد تازه تهیه کنید و سلولها را تا غلظت ۵ – ۱۰۰ × ۱۰^{3} سلول در میلی لیتر رقیق کرده و فقط ۱۰۰µl از سوسپانسیون را درون پلیت های ۹۶ خانه ته صاف، کشت دهید. بلافاصله دارو را به این پلیت ها اضافه کنید.

افزودن دارو:

۸- یک رقت سریال ۵ برابر از داروی سیتوتوکسیک، در محیط کشت رشد تهیه کرده تا هشت غلظت مختلف بدست آید. این سری غلظت ها باید به گونه ای انتخاب شوند که بالاترین غلظت، بیشتر سلولها را کشته و پایین ترین غلظت هیچ یک از سلولها را نکشد. هنگامی که سیتوتوکسیسیتی یک دارو مشخص می باشد، دامنهٔ محدودتری از غلظت ها را می توان استفاده کرد. معمولاً برای هر دارو سه پلیت استفاده می شود تا برای هر آزمایش سه نتیجه (triplicate determination) بدست آید.

۹- برای سلولهای چسبنده، محیط کشت چاهک های ستون های ۲ تا ۱۱ را خارج کنید. این کار را می توان با استفاده از یک سوزن مخصوص تزریق زیر پوستی (hypodermic needle) متصل به خط مکش انجام داد.

۱۰- سلولهای موجود در هشت چاهک ستونهای ۲ و ۱۱ را با ۲۰۰µl از محیط کشت رشد غذادهی کنید، این سلولها شاهد می باشند.

۱۱- داروی سیتوتوکسیک را به سلولهای ستونهای ۳ تا ۱۰ اضافه کنید. برای هر غلظت دارو فقط ۴ چاهک مورد نیاز می باشد، بنابراین ردیف های A-D را می توان برای یک دارو و ردیف های E-H را برای یک داروی دیگر استفاده کرد.

۱۲- محلولهای دارو را به پتری دیش های ۵cm انتقال داده و ۲۰۰µl از آنرا توسط یک سمپلر ۴ کاناله به هر کدام از گروههای چهار تایی چاهکها اضافه کنید.

۱۳- پلیت ها را به جعبه پلاستیکی بازگردانده و آنها را برای یک دورهٔ زمانی مشخص انکوبه کنید. برای سلولهای غیر چسبنده رقت دارو را دو برابر غلظت نهایی مورد نظر تهیه کرده و ۱۰۰µl از آنرا به ۱۰۰µl از سوسپانسیون سلولی که در چاهک ها وجود دارد، اضافه کنید.

دورهٔ رشد:

۱۴- در انتهای دورهٔ مجاورت با دارو، محیط کشت را از تمام چاهک های حاوی سلول خارج کرده و سلولها را با ۲۰۰µl از محیط کشت تازه غذادهی کنید. پلیت های حاوی سلولهای غیر چسبنده را سانتریفوژ کرده (۵ دقیقه در ۲۰۰g) تا سلولها ته نشین شوند. سپس با استفاده از یک سوزن باریک (fine-gauge needle) محیط کشت را خارج کرده تا از به هم خوردن رسوب سلولها ممانعت شود.

۱۵- پلیت ها را هر روز به مدت ۳-۲ PDT غذادهی کنید.

برآورد تعداد سلولهای زنده:

۱۶- در انتهای دوره پلیت را با ۲۰۰µl از محیط کشت تازه غذا دهی کرده و ۵۰µl MTT به تمام چاهک ها در ستون های ۱ تا ۱۱ اضافه کنید.

۱۷- پلیت ها را در فویل آلومینیومی پیچیده و آنها را به مدت ۴ ساعت در یک محیط مرطوب در دمای ۳۷°C انکوبه کنید. توجه شود که ۴ ساعت، حداقل زمان انکوباسیون بوده و پلیت ها را می توان تا ۸ ساعت انکوبه کرد.

۱۸- محیط کشت و MTT را از چاهک ها خارج کرده (برای سلولهای غیرچسبنده سانتریفوژ شود) و کریستالهای MTT- فورمازن باقی مانده را با افزودن ۲۰۰µl DMSO به تمام چاهک های ستونهای ۱ تا ۱۱ حل کنید.

۱۹- با فرگلیسین را به تمام چاهکهای حاوی DMSO اضافه کنید(۲۵µl برای هر چاهک).

۲۰- جذب را بلافاصله در طول موج ۵۷۰nm اندازه گیری کنید چون محصول ناپایدار است.

چاهک های ستون ۱ که حاوی محیط کشت و MTT بوده اما فاقد سلول هستند را برای دستگاه الیزا ریدر بعنوان بلانک استفاده کنید.

تجزیه و تحلیل آزمون MTT:

۲۱- منحنی جذب (محورy) بر حسب غلظت دارو (محورx) را رسم کنید.

۲۲- IC_{50} را به صورت غلظتی از دارو که برای کاهش میزان جذب به نصف میزان شاهد مورد نیاز است محاسبه کنید. جذب متوسط که از چاهک های ستونهای ۲ و ۱۱ خوانده می شود به عنوان یک شاهد استفاده می شود. میزان جذب ستونهای ۲ و ۱۱ باید یکسان باشد. هر چند گاهی اینگونه نمی باشد که نشان دهنده کشت نامساوی سلولها در عرض پلیت می باشد.

تغییرات در آزمون MTT

کاربردهای دیگر: همچنین یک آزمون مشابه برای تعیین حساسیت سلولها نسبت به پرتوها(radiosensitivity) استفاده می شود. MTT را می توان برای تعیین تعداد سلولها بعد از انواع مختلفی از تیمارهای دیگر به غیر از مجاورت با داروهای سیتوتوکسیک، از قبیل تحریک عامل رشد، استفاده کرد. هر چند، در هر مورد ضروری است که اطمینان حاصل کنیم که خود تیمار برروی توانایی سلول برای احیاء رنگ موثر نمی باشد.

مدت مجاورت: همانند آزمونهای کلونوژنیک، بعضی از عوامل ممکن است سریعتر عمل کرده و امکان دارد که مدت مجاورت و بازیافت کوتاه شود. سلولها باید در تمام مدت در رشد نمایی باقی مانده و غلظت سلولی در انتها باید هنوز در محدوده خطی آزمون دانسیته سنجی MTT باشد. وقتی که برای اولین بار از یک رده سلولی استفاده می شود، باید پلیت های موازی برای شمارش های سلولی تهیه شده تا یک نمودار رشد حاصل شود و برای جذب MTT – فورمازن تا اطمینان حاصل شود که هنوز جذب متناسب با تعداد سلولها می باشد. اگر منحنی رشد نشان دهد که سلولها در حال انتقال به فاز ایستایی هستند یا وقتی نمودار جذب بر حسب غلظت سلولی رسم شود، جذب خطی نباشد، آزمون را کوتاه کرده و مستقیماً به مرحله ۱۶ دستور کار بروید.

مدت زمان مجاورت، متناسب با تعداد چرخه های سلولی بوده که سلولها در طی مجاورت و بازیافت طی کرده اند. در

طی مجاورت نه تنها دانسیته سلولی سریعتر افزایش خواهد یافت بلکه همچنین پاسخ نسبت به داروهای وابسته به چرخه (cycle- dependent) سریعتر خواهد بود. مدت چرخه سلولی بر روی انتخاب بین یک آزمون نوع کوتاه و نوع بلند تأثیر خواهد داشت. وقتی یک آزمون برای اولین بار انجام می شود، نمونه برداری در هر روز از مجاورت دارو و بازیافت مطلوب است. اگر زودتر به یک IC_{50} ثابت برسیم، ممکن است آزمون کوتاه تر شود.

نقطه پایانی (end point): سولفورودامین یک رنگ فلورسنت بوده که پروتئینها را رنگ کرده و همچنین می تواند با تشخیص فلورسنت برروی دستگاه پلیت ریدر برای تعیین مقدار پروتئین (یعنی سلولها) در هر چاهک استفاده شود. این ماده همه سلولها را رنگ کرده و بین سلولهای زنده و مرده تمایزی قائل نمی شود.

نشاندار کردن با $[^3H]$- تیمیدین (سنتز DNA) و یا ایزوتوپهای دیگر را می توان جایگزین احیای MTT کرد. تعیین مقدار توسط شمارش سنتیلاسیون (scintillation) پلیت میکروتیتراسیون انجام می شود. دو نوع شمارش سنتیلاسیون موجود می باشد:

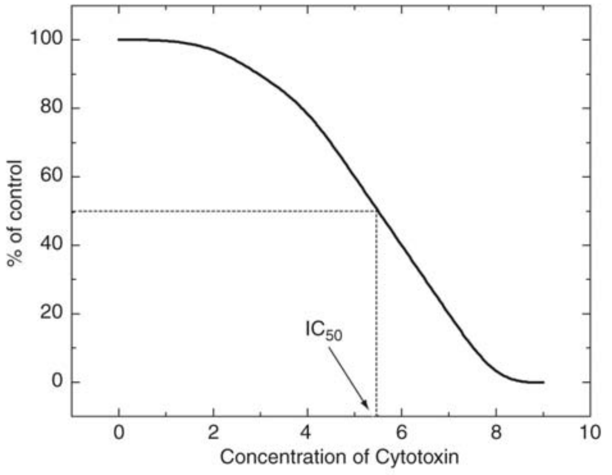
۱)ممکن است محتوای سلولی با تریپسینه کردن برروی فیلترها ریخته شده و یا با انتقال توسط مکش (suction transfer) روی فیلترهای الیاف شیشه (glass fiber) ریخته شود و سپس ممکن است فیلترها خشک شده و در سنتیلانت (scintillant) شمارش شوند یا

۲)ممکن است کل پلیت برروی یک شمارشگر سنتیلاسیون سازگار شده مخصوص (specially adapted scintillation counter) شمارش شود.

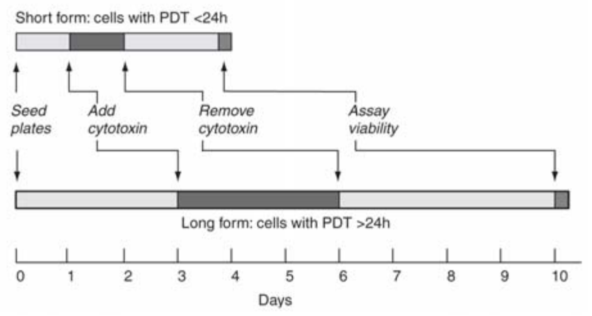
در عمل ممکن است مهم نباشد که در انتهای یک آزمون کدام معیار برای تعیین زیستایی و بقاء استفاده می شود بلکه طراحی آزمون مثل مدت زمان مجاورت با دارو، بازیافت و مرحله چرخه رشد (دانسیته سلولی، میزان رشد و غیره) مهمتر است.

مقایسه میکروتیتراسیون با بقاء کلونوژنیک

در میکروتیتراسیون حجم محیط کشت مورد نیاز برای هر نمونه کمتر از یک پنجاهم مقدار مورد نیاز برای کلونینگ می باشد، هر چند تعداد سلولها در هر دو روش یکسان می باشد. هر چند میکروتیتراسیون قادر به تشخیص بین پاسخ تمایزی میان سلولهای درون یک جمعیت و میزان پاسخ در هر سلول نمی باشد- مثلاً یک ممانعت ٪۵۰ می تواند به این معنی باشد که ٪۵۰ از سلولها پاسخ داده یا اینکه هر سلول توسط ٪۵۰ ممانعت می شود. مقایسه میان IC_{50} های حاصل از آزمون های



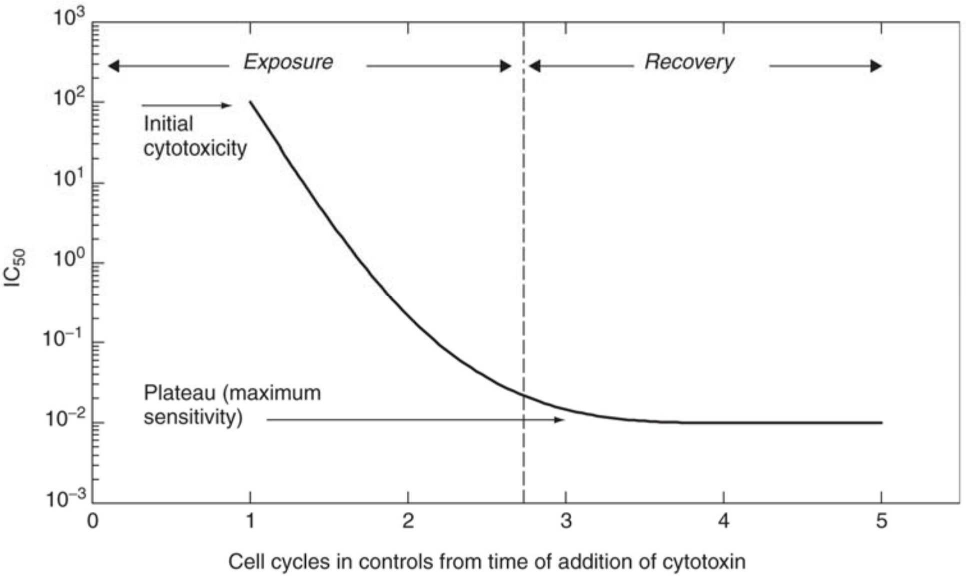
شکل ۶-۱۴: منحنی ممانعت درصدی. مقادیر چاهک مورد آزمایش به صورت درصدی از کنترل ها محاسبه شده و برحسب غلظت سیتوتوکسین رسم می شود. یک منحنی نیمه لگاریتمی به دست آمده که در شرایط بهینه، IC_{50} در مرکز خمیدگی منحنی واقع می شود.



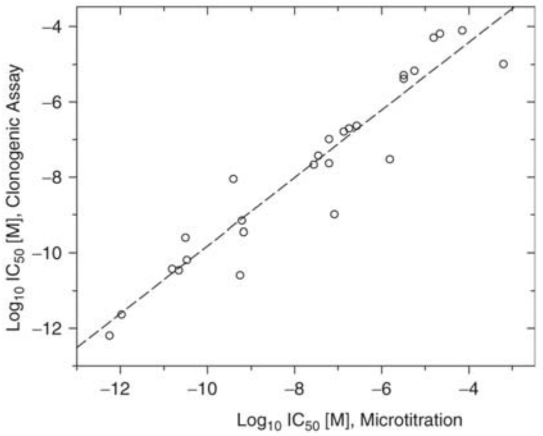
شکل ۷-۱۴: مدت زمان آزمون. الگوی آزمون های کوتاه مدت و بلند مدت. نمودار بالایی نشان دهنده آزمونی است که برای سلولهایی که دارای PDT کمتر از ۲۴ ساعت می باشند مناسب می باشد و نمودار پائینی نشان دهنده آزمونی است که برای سلولهایی با PDT بیش از ۲۴ ساعت مناسب می باشد، هر چند مقیاس های زمان حد وسط نیز امکان پذیر است.

میکروتیتراسیون و کارایی پلیتینگ، همبستگی زیادی را بین دو روش برای سنجش داروهای ضد تومور نشان می دهد.

یک مشخصه مهم آزمون های میکروتیتراسیون، مخصوصاً با مرحله پایانی رنگ سنجی (colorimetric) یا تشعشع سنجی(radiometric)، ایجاد مقادیر زیادی داده در فرمتی است که به آسانی توسط کامپیوتر تجزیه و تحلیل می شوند.



شکل ۸-۱۴: دوره زمانی نزول در IC_{50}. منحنی ایده آل برای یک ماده با افزایش تدریجی در سیتوتوکسیسیتی بر حسب زمان که در نهایت بعد از سه چرخه سلولی به حداکثر تأثیر می رسد. همه داروهای سیتوتوکسیک از این الگو تبعیت نمی کنند.



شکل ۹-۱۴: همبستگی بین میکروتیتراسیون و بقاء کلونوژنیک. اندازه گیری مقادیر IC_{50} یک گروه از پنج رده سلولی از گلیومای انسان و شش دارو(vincristine، bleomycin، epidophyllotoxin VM-26، 5-fluorouracil، methyl CCNU، mithramycin). اکثر نقاط دور از یک رده سلولی به دست آمده که بعداً مشخص شد که مخلوطی از انواع سلولهای مختلف می باشند. خط منقطع رگرسیون می باشد که با داده های رده سلولی ناهمگن حذف شده به دست آمده است. IC_{50} میکروتیتراسیون توسط ترکیب[^{35}S] متیونین حاصل شده است.

البته مشاهده داده های خام علاوه بر داده های آنالیز شده توسط کامپیوتر هم مهم است، چون گاهی فرضیات اولیه برنامه آنالیز کامپیوتری با فرضیات ما متفاوت می باشد یا گاهی بعضی از داده های نابجا توسط کامپیوتر حذف و اصلاح می شود.

بر همکنش دارویی

بررسی سیتوتوکسیسیتی، اغلب شامل مطالعه برهمکنش داروهای مختلف می باشد؛ برهمکنش دارویی به آسانی توسط سیستم های میکروتیتراسیون تعیین می شود، که در آن چندین نسبت مختلف از داروها می تواند به طور همزمان بررسی شود. تجزیه و تحلیل برهمکنش دارویی می تواند با استفاده از یک isobologram انجام شده تا داده ها را تفسیر کند. یک نمودار خطی دلالت بر یک پاسخ افزایشی داشته در حالیکه یک نمودار خمیده اگر خط منحنی در زیر خط پیش بینی شده قرار گیرد نشاندهنده سینرژی بوده و اگر خط منحنی بالای آن قرار گیرد نشاندهنده آنتاگونیست می باشد.

کاربردهای آزمونهای سیتوتوکسیسیتی

غربالگری داروی ضد سرطان

غربالگری دارویی برای شناسایی داروهای جدید ضد سرطان می تواند یک روش خسته کننده و اغلب ناکارآمد از کشف ترکیبات فعال جدید باشد. اکنون، تمایل بیشتر به سمت بررسی آثار برروی هدف های ملکولی خاص می باشد. هرچند، تلاشهایی برای اصلاح غربالگری با انجام آزمون های

سریع، که به آسانی قابل اتوماتیک شدن می باشند، شبیه آزمونهایی که براساس تعیین تعداد سلولهای زنده با رنگ کردن سلولها با MTT می باشد، صورت گرفته است. به منظور کاهش بیشتر دستکاری (manipulation)، مرحله انکوباسیون MTT حذف شده است و مرحله پایانی با اندازه گیری میزان کل پروتئین با استفاده از سولفورودامین B تعیین می شود. در حالیکه این روش سریعتر و آسانتر از سنجش MTT می باشد، باید خاطر نشان کرد که سلولهای غیر زنده و یقیناً غیرهمانندساز (nonrepliacting) هنوز رنگ خواهند شد، بنابراین باید وقتی فعالیت آشکار شد، سنجش با استفاده از یک نشانگر معتبرتر مثل کلونوژنیسیتی یا احیاء MTT تایید شود.

آزمایش دارویی پیشگویانه برای تومورها (predictive drug testing for tumors)

اغلب این احتمال در نظر گرفته می شود که حساسیت شیمیایی (chemosensitivity) سلولهای مشتق از یک تومور بیمار ممکن است در طراحی یک رژیم شیمی درمانی برای بیمار استفاده شود. این تکنیک بطور کامل آزمایش نشده است، هرچند نتایج حاصل از کارهای صورت گرفته در مقیاس کوچک، دلگرم کننده می باشد. چیزی که اکنون مورد نیاز می باشد، توسعه تکنیک های کشت معتبر و تجدید پذیر (reproducible) برای اغلب تومورهای متداول (مثل سینه، ریه، کولون) می باشد، به طوریکه کشت های سلولهای توموری خالص که قادر به تکثیر سلولی طی چندین چرخه سلولی می باشند، ممکن است به طور عادی تهیه شوند. سپس ممکن است آزمون ها در موارد زیادی در طی ۲ هفته از دریافت بیوپسی انجام شود.

ترانسفورماسیون و موتانزایی

آزمونهای متداول مورد استفاده در *in vitro* برای ترانسفورماسیون شامل استقلال لنگرگاهی (anchorage independence)، کاهش محدودیت چگالی تکثیر سلولی و شواهد جهش زایی می باشد. جهش زایی را می توان با مبادله کروماتید خواهری سنجید؛ این روش در دستور کار بعدی شرح داده شده است.

آزمون موتان زایی توسط تبادل کروماتید خواهری

مبادلات کروماتید خواهری (Sister Chromatid Exchanges: SCEs) ، مبادلات دو طرفه قطعات DNA بین کروماتیدهای خواهری در موقعیت های مشابه در طی فاز S چرخه سلولی می باشد. چون SCEs نشانگر بسیار حساستری از فعالیت جهش زایی نسبت به شکست های کروموزومی می باشد، به یک ابزار عمده در تحقیقات جهش زایی تبدیل شده است.

با توسعه آنالوگ تیمیدین، بروموداکسی اوریدین(BUdr) و استفاده بعدی آن در آزمایشات نشاندار کردن DNA، در مقایسه با روشهای قبلی که شامل ترکیب نوکلئوتیدهای رادیواکتیو در DNA در حال تکثیر می باشند، قدرت تشخیص SCEs به میزان زیادی افزایش می یابد. بعدها، تکنیک فلورسنس بعلاوه گیمسای Perry و Wolf برای امتیازبندی SCEs تقویت شد و رنگ آمیزی دائمی SCEs نیز شرح داده شد. قبلاً در طی فرایند امتیازبندی، از بین رفتن سریع رنگ فلورسنت اتفاق می افتاد.

روش FPG شامل دو مرحله مجزا می باشد: ۱) سلولها برای دو چرخه کامل با BUdR نشاندار شده و سپس برای توقف سلولها در متافاز با کلسمید(colcemid) تیمار می شوند. بعد از مجاورت با BUdR، DNA یک کروماتید از هر کروموزوم حاوی بروموراسیل در یک رشته می باشد، در حالیکه DNA کروماتید خواهری دارای بروموراسیل در هر دو رشته می باشد. ۲) سپس کروموزومها از این سلولها تهیه شده و با رنگ فلورسنت Hoechst 33258 رنگ شده ، BUdR با نور ماوراء بنفش تجزیه نوری شده و سپس با گیمسا رنگ می شود. این مراحل نهایی ترکیب افتراقی برمواوراسیل در کروماتیدهای خواهری را برجسته می کند. DNA که حاوی برمواوراسیل می باشد، فلورسانس کمپلکسهای Hoechest- DNA را سرکوب می کند. بنابراین کروماتید حاوی برمواوراسیل جایگزین شده در هر دو رشته، فلورسانس ضعیفی داشته و به میزان کمی توسط گیمسا رنگ می شود، در حالیکه کروماتیدهایی که فقط در یک رشته دارای برمواوراسیل می باشد، بیشتر دارای خاصیت فلورسانس بوده، BUdR تجزیه شده و در نتیجه به صورت تیره با گیمسا رنگ می شود. اگر هر گونه تبادلات کروماتید خواهری روی داده باشد، این الگوی رنگ آمیزی کروموزومهای دلقک (harlequin chromosomes) را تولید می کند.

دستور کار۵-۱۴ – تبادل کروماتید خواهری

طرح کلی

سلولهایی که در فاز متافاز متوقف شده اند و به مدت دو چرخه با BUdR نشاندار شده اند را تریپسینه کرده، سلولها را در بافر هیپوتونیک انکوبه کرده و سپس سلولها را فیکس کنید. بعد از تیمار سلولها با Hoechst 33258 و تجزیه نوری گسترش کروموزمی، از سلولها لام تهیه کنید. کروموزومها را با

گیمسا رنگ کرده و زیر میکروسکوپ نوری با روغن ایمرسیون مشاهده کنید.

مواد

استریل:

D-PBSA

PE: ۱۰mM EDTA در PBS

تریپسین: ۰/۱۲٪ در PE

BUdR : استوک ۱mM را در آبUPW استریل تهیه کنید.

Karyomax: کلسمید ۱۰µg/mL

محیط کشت رشد

غیراستریل:

۲× SSC : رقت ۱:۱۰ از۲۰× SSC

بافرهیپوتونیک :۰/۰۷۵ M KCL

بافر Sorensen: بافر فسفات ۰/۰۶۶M با pH ۶/۸

متانول : اسید استیک ۳:۱ ، سرد شده در یخ و تازه تهیه شده

محلول گیمسا ۰/۷۶٪ : ۱g از پودر گیمسا را در ۶۶m1 گلیسرول ریخته و در یک حمام آب در دمای۶۰°C-۵۶ به مدت ۲-۱/۵ ساعت گرم کنید. محلول را سرد کرده و ۶۶mL الکل مطلق به آن اضافه کنید.

گیمسا، رقیق شده تا ۳/۵٪ در بافر Sorensen، pH ۶/۸

Hoechst 33258، ۲۰µg/mL در UPW

گزیلن

DPX mountant

لاملهای ۱۵mm × ۲۲

جار Coplin

رک لام

لامپ UV با طول موج کوتاه در جعبه پرتو تابی

نکته ایمنی) Hoechst 33258 سرطانزا بوده آنرا بیرون وزن کرده و در داخل یک هود شیمیایی حل کنید.

دستور کار

پیش تیمار:

۱-سلولها را در دانسیته مناسب (مثلاً $۱۰^{۶}$ × ۱ سلول در هر فلاسک $۷۵cm^{2}$) بذرافشانی کرده و به مدت ۲ روز در ۳۷°C انکوبه کنید.

۲-BUdR را با غلظت نهایی ۱۰µM به محیط کشت اضافه کنید.

۳-سلولها را در تاریکی و در دمای ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت دیگر (تقریباً دو چرخه سلولی) انکوبه کنید.

۴-کلسمید را ۶-۱ ساعت قبل از جمع آوری سلولها، بر حسب زمان چرخه سلولها به آنها اضافه کنید. برای رده های سلولی انسانی، غلظت نهایی کلسمید باید۰/۰۱µg/mL باشد.

جمع آوری سلولها:

۵-سلولها را با PBS شستشو داده با استفاده از ۱mL از تریپسین ۰/۱۲٪ در PE تریپسینه کنید.

۶-سلولها را مجدداً در ۱۰mL از محیط کشت رشد به حالت تعلیق در آورید. سوسپانسیون سلولی را به لوله های فالکون ۵۰mL انتقال دهید.

۷-سوسپانسیون را به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

۸-سوپرناتانت را خارج کرده، تقریباً ۱/۲mL از سوپرناتانت بالای رسوب را باقی بگذارید. با ضربه آهسته به لوله، رسوب را حل کنید.

۹-به طور آهسته ۱۰mL از بافر هیپوتونیک (که تا۳۷°C گرم شده است) را اضافه کرده و سوسپانسیون سلولها را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه کنید.

۱۰-سلولها را در یک سانتریفوژ رومیزی به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

۱۱- سوپرناتانت را خارج کرده، ۱/۲mL از سوپرناتانت بالای رسوب را نگه می داریم. به لوله ضربات آهسته ای وارد کرده تا رسوب حل شود.

۱۲- ۱۰mL از ثابت کننده (fixative) سرد شده در یخ را ابتدا به صورت قطره قطره اضافه کرده، بعد از هر بار اضافه کردن به خوبی مخلوط می کنیم. لوله را به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار دهید.

۱۳- مراحل ۱۱-۹ را یکبار دیگر تکرار کرده، اجازه دهید که سلولها به مدت یک شب در دمای ۴°C در ثابت کننده باقی مانده تا تهیه اسلاید بهتر شود.

۱۴- سلولهای تثبیت شده را به مدت مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰rpm سانتریفوژ کرده و سلولها را در ۳-۵mL متانول / اسیداستیک مجدداً به حالت تعلیق در آورید.

۱۵- سلولها را در دمای-۲۰°C ذخیره کنید.

تهیه لام:

۱۶- لامها باید قبل از استفاده تمیز و فاقد چربی باشند، بنابراین آنها را با الکل مطلق پاک کنید.

۱۷- با استفاده از پی پت پاستور شیشه ای کوتاه ، تقریباً ۵۰۰mL از سلولهای تثبیت شده را بردارید.

۱۸- لامل را در یک زاویه رو به پایین نگه داشته و پی پت پاستور را تقریباً ۱۵cm بالای لام نگه داشته و ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی را روی لام بچکانید.

۱۹- لام را در تاریکی و در مجاورت هوا بخشکانید.

۲۰- لام را زیر میکروسکوپ فازکنتراست بررسی کرده تا مطمئن شوید که تعداد یکنواختی از گسترش های متافاز

در وسط لام وجود داشته و اینکه کروموزومها به خوبی جدا شده اند.

رنگ آمیزی دلقک:

۲۱- لام ها را به مدت ۱۰ دقیقه در یک جار Coplin حاوی Hoechst 33258 با غلظت ۲۰µg/mL غوطه ور کنید (چون Hoechst سمی می باشد دستکش بپوشید).

۲۲- لامل ها را به یک رک مخصوص لام انتقال داده و ۵۰۰µL از SSC با غلظت ۲× را بر روی هر لام بریزید.

۲۳- لامل ها را با یک لامل ۲۲mm×۵۰mm پوشانده و لبه های آنرا با یک چسب موقتی پوشانده تا از تبخیر جلوگیری شود.

۲۴- لام ها را برروی راک لام قرار داده به صورتی که سطح دارای لامل به سمت پایین باشد و راک را برروی یک جعبه UV با طول موج کوتاه قرار دهید. فاصل بین لامها و منبع UV را تقریباً ۴cm نگهدارید. هر چقدر لامها به مدت بیشتری در معرض UV قرار گیرند، کروماتیدها کمرنگ تر خواهند شد.

لام ها را به مدت حدود ۶۰-۲۵دقیقه در مجاورت UV قرار دهید.

۲۵- لامل ها را از روی لام ها برداشته و لام ها را سه مرتبه با UPW، و هر دفعه به مدت ۵ دقیقه بشویید. جعبه حاوی لامها را با یک فویل آلومینیومی بپوشانید.

۲۶- لام ها را در تاریکی در مجاورت هوا بخشکانید.

۲۷- لام ها را در جار Coplin حاوی محلول گیمسا ۳/۵٪ در بافر Sorensen با pH ۶/۸ به مدت ۵-۳ دقیقه رنگ کنید.

۲۸- با دقت لامها را با آب شیر آبکشی کرده و با استفاده از یک دستمال کاغذی خشک کنید.

۲۹- لامها را برروی میزکار به مدت ۱ ساعت در مجاورت هوا بخشکانید. هر لام را در گزیلن فرو برده، ۴ قطره DPX mountant روی اسلایدها ریخته و یک لامل ۵۰mm × ۲۲ را روی آن قرار دهید (این مرحله آخر را در یک هود شیمیایی انجام دهید، زیرا بخارات گزیلن سمی می باشند همچنین از دستکش استفاده کنید).

۳۰- لامل را در یک هود شیمیایی به مدت یک شب در مجاورت هوا بخشکانید.

تجزیه و تحلیل :

۳۱- زیر عدسی شیئی ۴۰× یک میکروسکوپ نوری، لام ها را از لحاظ گسترش های متافازی بررسی کنید.

۳۲- ناحیه ای را روی لام ها پیدا کنید که اغلب گسترش های متافازی در آن جا قرار گرفته اند و این ناحیه را زیر روغن ایمرسیون بررسی کنید.

۳۳- زمانیکه هیچگونه مبادلات کروماتید خواهری رخ نداده باشد، هر کروموزوم دارای یک کروماتید بوده که به صورت پیوسته کمرنگ بوده و یک کروماتید که به صورت پیوسته تیره رنگ شده است. وقتی که یک ناحیه تیره رنگ و سپس رنگ آمیزی روشن روی یک کروماتید وجود داشته و روی کروماتید خواهری یک ناحیه با رنگ روشن و سپس تیره رنگ وجود داشته باشد یک SCE رخ داده است.

هر نقطه از ناپیوستگی (discontinuity) در رنگ آمیزی بعنوان یک SCE در نظر گرفته می شود.

۳۴- تعداد SCEs را در هر سلول و همچنین تعداد کروموزومها در هر سلول را شمارش کنید.

۳۵- معمولاً کروموزومهای بزرگ نسبت به کروموزومهای کوچکتر تعداد بیشتری از SCEs دارند و میزان SCEs ممکن است از سلولی به سلول دیگر متفاوت باشد. بنابراین محاسبه تعداد SCEs در هر کروموزوم دقیق تر از اندازه گیری میزان SCE می باشد.

محاسبه SCE با فرمول زیر می باشد:

$$\text{میزان SCE} = \frac{\text{میانگین تعداد SCEs سلول}}{\text{میانگین تعداد کروموزومهای هرسلول}}$$

هدف، محاسبه تقریباً پنجاه گسترش در هر رده سلولی مورد مطالعه می باشد.

تغییرات: نشاندار کردن ضربانی (pulse) سلولها با BUdR و سپس رنگ آمیزی آن همانگونه که قبلاً شرح داده شد، می تواند تفاوتهای موجود در نواحی در حال همانندسازی زود و دیر (early and late) کروموزومهای را در طی چرخه سلولی مشخص سازد. وقتی سلولها با BUdR در قسمت انتهای چرخه سلولی نشاندار می شوند، DNAهایی که زود همانندسازی می شوند با گیمسا به صورت تیره رنگ خواهند شد چون مقدار بسیار کمی از BUdR با آنها ترکیب می شود و برای نواحی از کروموزوم که در مراحل اولیه (early) چرخه سلولی pulsed می شوند، فقط آن نواحی هایی که DNA خود را در ابتدا همانندسازی می کنند با گیمسا به صورت کمرنگ رنگ خواهند شد.

بعلاوه سلولهایی که فقط یک چرخه سلولی از نشاندار شدن پیوسته با BUdR را طی کرده اند، به دلیل تفاوت در محتوای تیمین DNA فقط در باندهای معین (Latteral asymmertry) رنگ آمیزی افتراقی کروماتیدها را نشان می دهند. همچنین بعد از تجزیه نوری BUdR، رنگ فلورسانس آکریدین اورنج (acridine orange) می تواند برای رنگ کردن SCEs استفاده شود. با این رنگ در نواحی که دارای DNA دو رشته می باشند و بنابراین مقدار کمی با BUdR ترکیب شده اند، فلورسانس سبز دیده می شود و در نواحی که دارای DNA تک رشته ای می باشند جایی که

BUdR ترکیب خواهد شد به صورت فلورسانس قرمز مشاهده می شود. در نتیجه، فلورسانس قرمز معادل با رنگ آمیزی روشنتر با گیمسا بوده و فلورسانس سبز معادل رنگ آمیزی تیره تر با گیمسا می باشد.

سرطانزایی (carcinogenicity)

پتانسیل آزمایش *in vitro* برای سرطانزایی قابل توجه می باشد اما این یک حوزه ای است که آزمایشات *in vivo* بسیار بیشتر از مقدار مورد نیاز است، مدلها کم هستند و اغلب انجام آزمایشات به هفته ها یا ماهها زمان نیاز دارد. از توسعه یک آزمایش *in vitro* رضایت بخش ۱) بعلت فقدان یک معیار قابل قبول عمومی برای ترانسفورماسیون بدخیم در *in vitro* و ۲) بعلت پایداری ذاتی سلولهای انسانی مورد استفاده بعنوان هدف جلوگیری می شود.

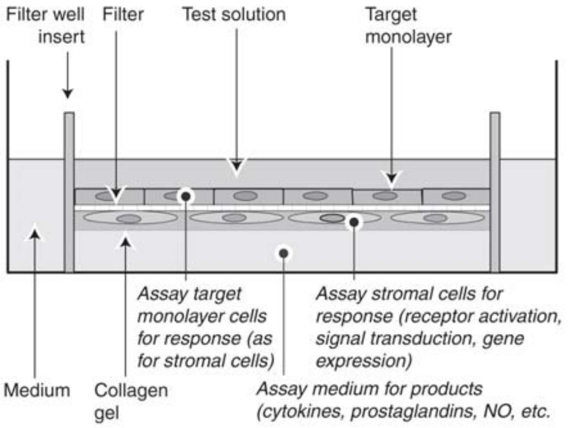
عمومی ترین آزمایشات پذیرش شده تا کنون فرض کرده اند که سرطانزایی در اغلب موارد مربوط به جهش زایی می باشد. این فرض، اساس آزمایشات Ames می باشد که در آن باکتریها بعنوان هدف استفاده شده و فعالسازی می تواند با استفاده از نمونه های آنزیمی میکروزومی کبد انجام شود. این آزمایش یک ارزش پیش گویی کننده بالایی دارد اما با وجود این، تفاوت هایی در جذب، حساسیت و نوع پاسخ سلولی منجر به معرفی آزمایشات دیگر با استفاده از سلولهای پستانداران و انسان به عنوان هدف شده است.

همچنین بعضی ازاین آزمایشات، آزمون های جهش زایی با استفاده از سوسپانسیون های سلولهای لنفوما L5178Y بعنوان هدف و القاء یا بازگشت جهش ها یا شاهد سیتولوژیکی از تبادل کروماتید خواهری بعنوان مدرک جهش زایی می باشند. افراد دیگر از ترانسفورماسیون بعنوان یک نقطه پایانی (end point) استفاده کرده اند، و کلونوژنیسیتی در سوسپانسیون را بعنوان یک معیاری برای ترانسفورماسیون سنجش می کنند. منتقدان این سیستم ها می گویند که هر دو سلولهای مورد استفاده که هم اکنون به طور جزئی بعنوان سلول هدف ترانسفورمه شده اند، حتی سلول BHK21- C13 که توسط بعضی از محققان استفاده شده است، یک رده سلولی پیوسته بوده و ممکن است کاملاً طبیعی نباشد. بعلاوه قسمت عمده سرطانهای متداول در بافت های پوششی و نه در سلولهای بافت همبند رخ می دهد.

التهاب

نیاز فزاینده ای برای آزمایشات کشت بافت برای آشکار کردن پاسخ های التهابی که احتمالاً توسط مواد دارویی و مواد آرایشی با کاربرد موضعی و یا توسط گزنوبیوتیک هایی (xenobiotics) که ممکن است استنشاق یا بلعیده شوند و ممکن است عامل ایجاد بسیاری از اشکال حساسیت باشند، وجود دارد. این عرصه ای است که تازه در ابتدای تکامل خود می باشد اما درآینده نوید بخش می باشد. گروههای حمایت کننده از حیوانات در مورد استفاده از تعداد زیادی از حیوانات برای آزمایش مواد آرایشی جدید که منفعت اندکی داشته به جز اینکه برای شرکت سازنده سود آور می باشد، بخصوص زمانیکه آزمایش ماده (از قبیل شامپو) شامل آزمایش Draize می باشد که در آن ترکیب به چشم خرگوش افزوده می شود، هشدار می دهند. از لحاظ کلینیکی موضوع مهمتر، افزایش آشکار در پاسخ های حساسیت زا (allergenic) می باشد که توسط مواد دارویی و گزنوبیوتیک ها تولید می شود. این پاسخ ها کمتر درک شده و به میزان کمی کنترل شده است که دلیل عمده آن عدم وجود یک آزمایش *in vitro* ساده می باشد.

از زمان ظهور فناوری چاهک فیلتردار، چندین مدل برای پوست و قرنیه بوجود آمده که از این فناوری برای کشت توأم انواع سلولی مختلف استفاده می کند. در این سیستم ها، برهمکنش یک ماده حساسیت زا (allergen) یا ماده محرک(irritant) با یک هدف اولیه (مثل اپیدرم) موجب می شود که یک پاسخ پاراکراین (paracrine response) شروع شده که باعث آزادسازی یک سیتوکین از یک جزء استرومایی ثانویه (مثل درم) می شود. سپس این سیتوکین را می توان با فناوری ELISA برای بررسی میزان پاسخ اندازه گیری کرد. علیرغم مراحل اولیه تکامل این فناوری، برای اندازه گیری پاسخ های محرک، کمیت هایی وجود دارد. یک دستور کار برای کشت قرنیه مناسب برای الگوسازی پاسخ های محرک در چشم توسط Carolyn Cahn تهیه شده است.



شکل ۱۰-۱۴: آزمون ارگانوتاپییک. یک سیستم آزمون فرضی برای در معرض قرار دادن یک لایه سلولی (مثلاً کراتینوسیت های اپیدرمی) که با یک نوع سلول همراه دیگر (مثل فیبروبلاست های پوست در ژل کلاژن) کشت همزمان شده اند با یک ماده محرک و اندازه گیری پاسخ توسط آزاد سازی سیتوکین.

فصل پانزدهم

کشت انواع سلول های اختصاصی

برای بسیاری از افراد، کشت سلولی روشی برای تولید مقدار کافی سلول ها برای یک فرآیند تولیدی یا آزمایشی می باشد. هر چند برای افراد دیگر علاقه رو به افزایشی به انواع سلول های اختصاصی برای بررسی فرایندهای اختصاصی و آسیب شناسی آنها یا برای استفاده در درمانهای بر پایه سلول وجود دارد.

تولید یک کشت سلولی تخصصی به چندین روش می تواند انجام پذیرد:

۱)با جداسازی سلول های تمایز یافته یا بافت برای کشت های غیرتکثیر شونده کوتاه مدت

۲)با جداسازی سلول های پیش ساز، قرار دادن آنها در شرایط کشت انتخابی و سپس القاء آنها به تمایز یا

۳)با جداسازی سلول های بنیادی و ایجاد کشت هایی که جمعیت سلول بنیادی را تکثیر کرده یا به سمت یکی از چندین فنوتیپ تمایزی ممکن به پیش می برد.

در هر مورد تکنولوژی متفاوت بوده و در این فصل سعی می شود که تعدادی از این تکنولوژی های انواع اختصاصی بافت معرفی شوند.

کشت سلولی سلول های اختصاصی

توسعه تکنیک هایی برای نامیرا کردن رده سلولی به این معنی می باشد که تولید رده های سلولی پیوسته از تعدادی از رده های متناهی از بافت غیر ترانسفورم شده امکان پذیر بوده است. در بسیاری از موارد، خواص تمایزی از دست رفته اما با استفاده از یک پروموتور قابل روشن و خاموش شدن (switchable promoter) (مثل حساسیت به حرارت)، امکان دارد فنوتیپ تمایز یافته به حالت اول برگردد. توسعه موش های تراریخته (transgenic) حامل ژن T بزرگ از SV40 دامنه وسیعی از امکانات را گشوده است، چون سلول های کشت داده شده از این حیوانات نامیرا بوده اما هنوز بعضی از عملکرد های تمایزی را حفظ کرده اند.

بسیاری از سلول های تخصصی (مثل کراتینوسیت های اپیدرمی، ملانوسیت ها، سلول های اندوتلیال، سلول های عضلات صاف، فیبروبلاست های درم، ملانوسیت ها و اپی تلیوم پستان) به صورت تجاری در دسترس می باشند. طبیعتاً هزینه این سلولها بسیار بالاست اما با افزایش تقاضا، هزینه ممکن است کاهش یابد. همچنین کشت های پوستی از قبیل(Epiderm (MatTek ، Episkin (Saduc) و SkinEthic برای تحقیقات سیتوتوکسیستی و التهاب در دسترس می باشد. این محصولات در چاهک های فیلتر دار با ترکیب کردن کراتینوسیت ها با فیبروبلاست ها و کلاژن های پوستی حمایت شونده با یک شبکه نایلون به اصطلاح معادل پوست تهیه می گردند. بافت های دیگر مخصوصاً قرنیه به یک روش مشابه برای مطالعات سمیت تهیه شده است.

سلول های اپی تلیال

سلول های اپی تلیال مسئول عملکرد های شناخته شده بسیاری اندامها (مثل جذب کنترل شده در کلیه و روده، ترشح در کبد و پانکراس، تبادل گاز در ریه و سد حفاظتی در پوست) می باشند. همچنین سلول های اپی تلیال به عنوان مدل هایی از تمایز و کنتیک سلول بنیادی (مثل کراتینوسیت های اپیدرمی) مورد توجه می باشند و از بافت های عمده ای است که سرطان های متداول در آن روی می دهد. در نتیجه، کشت سلول های اپی تلیال مختلف برای سالیان درازی مورد توجه بوده است. مشکل عمده در کشت اپی تلیوم خالص، رشد بیش از حد سلول های استرومایی (stromal cells) از قبیل بافت همبند، فیبروبلاست ها و اندوتلیوم عروقی می باشد. اغلب برای ممانعت از این رشد اضافی، از دستکاری غذایی محیط کشت یا تغییر بستر کشت استفاده می شود تا رشد سلول های اپیدرم تمایز نیافته و ترجیحاً سلول های بنیادی افزایش یابد.

فاکتورهای موجود در سرم که بسیاری از آنها از پلاکت ها منشأ گرفته اند، دارای یک اثر میتوززا(mitogenic) قوی بر

روی فیبروبلاست ها بوده و با القاء تمایز نهایی منجر به ممانعت از تکثیر اپی تلیال می شوند. در نتیجه یکی از مهم ترین پدیده ها در جداسازی و تکثیر کشت های سلولی اختصاصی، توسعه محیط های کشت بدون سرم انتخابی می باشد که با فاکتورهای رشد مخصوص تکمیل شده اند.

جداسازی سلول های اپی تلیال از بافت دهنده با کلاژناز به بهترین صورت انجام می شود که استروما را پراکنده کرده اما سلول های اپی تلیال در دستجات کوچک باقی مانده و بقاء خود را حفظ می کنند.

اپیدرم

به دلیل پیشرفت در فناوری پایه کشت سلولی و پیشرفت فهم ما از نیازمندی های کشت بافت های اپی تلیال مختلف، کراتینوسیت های اغلب اپی تلیوم های مطبق را اکنون می توان رشد داد و در کشت سلولی مطالعه کرد. اغلب اپی تلیوم سنگفرشی (squamous) پوست و سلول های اپی تلیال جداسازی شده آن و کراتینوسیت ها، برای مطالعه فیزیولوژی و پاتولوژی در *in vitro* استفاده می شوند. بعلاوه سلول های موکوس دهانی و همچنین زوائد پوستی از قبیل فولیکول مو تحت شرایط مختلف جداسازی و کشت داده شده اند و بافت های بازسازی شده در کشت به خوبی عضوهای ترانسپلنت های(transplants) تشکیل شده است.

به منظور جلوگیری از رشد بیش از حد سلول های مزانشیمال، قسمت اپی تلیال از بافت همبند جدا شده و به صورت سلول های منفرد در آمده که سپس بر روی بسترهای مختلف با استفاده از فرمولاسیون های مختلف محیط کشت، کشت داده شده اند. متداول ترین و قابل اعتماد ترین روش مورد استفاده تکنیک لایه تغذیه کننده می باشد که ابتدا توسط Greenو Rheinwald (در سال ۱۹۷۵) به کار رفت. آنها از سلول های 3T3 پس میتوزی (postmitotic) (پرتوتابی شده یا تیمار شده با میتومایسین C) به عنوان تغذیه کننده های مزانشیمال استفاده کردند. فیبروبلاست های اولیه که از درم یا زیرمخاط (submucosa) منشأ گرفته اند و پس میتوزی شده اند را می توان به جای سلول های 3T3 استفاده کرد. سلول های تغذیه کننده دامنه وسیعی از عملکردهای فیزیولوژیکی را حفظ کرده اند.

همچنین کراتینوسیت ها را بدون سلول های تغذیه کننده در محیط های کشت فاقد سرم که با عصاره هیپوفیز (pituitary extract) با انواع مختلف فاکتورهای رشد و مکمل های دیگر تکمیل شده یا در غلظت های پائین Ca^{2+} (۰/۰۶ mM – ۰/۰۳) برای جلوگیری از لایه لایه شدن یا در غلظت طبیعی Ca^{2+} (۱/۴ mM – ۱/۲) برای لایه لایه شدن و کراتینه شدن می توان کشت داد. هرچند نگهداری در دانسیته سلولی بالا در واکشت، در حضور سلول های تغذیه کننده (مثل سلول های 3T3 پرتوتابی شده) یا کشت در حضور غلظت پایین کلسیم در محیط کشت بدون سرم، به کاهش آلودگی فیبروبلاست کمک می کند، سلولهای مزانشیمال توسط این روش به طور کامل حذف نمی شوند.

دستور کار ۱-۱۵- کراتینوسیت های اپیدرمی

طرح

اپیدرم را با روش آنزیمی از درم جدا کرده، کراتینوسیت ها را پراکنده کرده و آنها را در یک محیط کشت بدون سرم یا روی یک لایه تغذیه کننده که رشد آن متوقف شده است بذرافشانی کنید.

مواد

استریل:

لایه های تغذیه کننده تهیه شده ۳ روزه (3T3 پرتوتابی شده در ۳۰ GY و فیبروبلاست های انسانی در ۷۰ GY)

FAD : محیط کشت دارای کلسیم زیاد برای کشت های لایه تغذیه کننده ؛ Ham's F12 و DMEM با افزودنیهای آن مطابق فرمولاسیون WU و همکارانش: Ham's F12: DMEM به نسبت ۳ : ۱ که با آدنین ($۱/۸ \times ۱۰^{-۴}$ M) سم کلرا (۱۰×۱^{-۱۰} M) ، EGF (۱۰-۱ ng/L) ، هیدروکورتیزون (۰/۴ µg/mL) و FCS ٪ ۱۰-۵ و همچنین آنتی بیوتیک های پنی سیلین (۱۰۰U/mL) و استرپتومایسین (۵۰ µg/mL) تکمیل شده است.

محیط کشت رشد کراتینوسیت (KGM) : محیط کشت بدون سرم که بر اساس فرمولاسیون اصلی محیط کشت MCDB 153 که توسط Ham و Boyce طراحی شده که با عصاره هیپوفیز تکمیل شده است و دارای Ca^{2+} کم (۰/۰۳-۰/۵ mM) می باشد که می تواند با افزودن $CaCl_2$ افزایش یابد.

محیط کشت تعریف شده کراتینوسیت (KDM) : محیط کشت بدون سرم بر اساس فرمولاسیون اصلی محیط کشت MCDB 153 که توسط Ham و Boyce طراحی شده است.

KDM تکمیل شده (SKDM):

a) محیط کشت تعریف شده کراتینوسیت (KDM) بدون عصاره هیپوفیزه

b) مکمل های : انسولین (۵µg/mL) ، هیدروکورتیزون (۰/۵ µg/mL)، rhEGF (۰/۱ ng/mL) ، ترانسفرین (۲۰ µg/mL) ، آلبومین سرم گاوی بسیار خالص شده ٪ ۰/۱ (بدون اندوتوکسین و اسیدهای چرب) و L– اسکوربیک اسید (۵۰ µg/mL)

c) تنظیم Ca^{2+} تا ۱/۳ mM

d) کشت های کراتینوسیت اولیه را می توان بر روی دیش های پلاستیکی بدون پوشش (uncoated) در SKDM هر چند با فعالیت تکثیری پایین نگهداری کرد. وقتی کراتینوسیت ها بر روی دیش های پوشیده شده با کلاژن (نوع I) کشت می شوند، رشد آنها افزایش می یابد.

D-PBSA

EDTA (٪ ۰/۵)

گلیسرول (گرید خالص) (analytical grade)

محیط کشت FAD با ٪۲۰ FCS و ٪۱۰ گلیسرول

آنزیم های :

(a) ترمولیزین (T-7902 سیگما)

(b) تریپسین (۲۵۰ : ۱ ؛ ۰/۲ و ٪ ۰/۶)

(c) دیسپاز (گرید II ، ۲/۴ U/mL ، Boehringer Mannheim)

آمپول های مخصوص منجمد نگهداری

محلول بتادین (٪۱۰ ید)

لوله سانتریفوژ ۵۰ mL

گاز(تنزیب) نایلون

صافی سلولی(cell strainer)

پتری دیش های باکتریولوژی ۱۰ cm

اسکالپل، پنس خمیده

دستور کار

نمونه ها:

۱- پوست ختنه گاه (foreskin) (مربوط به نوزاد و همچنین نوجوان) متداولترین منشأ آزمایشگاهی برای پوست انسان یا پوست تنه (trunk) که از طریق جراحی یا پس از مرگ (تا ۴۸ ساعت) بدست می آید را تهیه کنید. به نظر می رسد کراتینوسیت هایی که از پوست ختنه گاه منشأ گرفته اند بهتر از سلول هایی که از پوست بالغ بدست آمده اند چسبیده و تکثیر می شوند.

۲- بیوپسی های پوست را تا ۳۰ دقیقه در محلول بتادین (٪۱۰ید) قرار داده تا از آلودگی جلوگیری شود (این کار میزان زیستایی کراتینوسیت ها را کاهش نمی دهد).

۳- نمونه را دو بار با D-PBSA و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه شستشو دهید.

جداسازی اپیدرم:

۴- پوست کامل (full-thickness) را توسط یک Castroviejo dermatome (دستگاه Storz) به قطعات ۰/۲ mm -۰/۱ برش دهید. همچنین بافت زیرپوستی و قسمتی از درم را می توان توسط قیچی خمیده برداشت.

۵- پوست را توسط اسکالپل به قطعات ۱×۲ cm برش دهید.

۶- بافت را ۲ تا ۵ مرتبه در D-PBSA شستشو دهید.

۷- بافت را به همراه پروتئاز توسط یکی از مراحل زیر انکوبه کنید:

a) تریپسین: نمونه های پوست را در تریپسین ٪ ۰/۶ در D-PBSA (pH ۷/۴) به مدت ۳۰- ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C غوطه ور کنید.

b) تریپسین سرد: نمونه را در تریپسین ٪ ۰/۲ سرد شده در یخ به مدت ۲۴-۱۵ ساعت در دمای ۴°C غوطه ور سازید. pH محلول تریپسین باید با فنل رد نمایش داده شده تا از تغییر فعالیت آنزیم و زیستایی سلولی جلوگیری شود.

c) دیسپاز(گرید II): با ۲/۴ U/mL به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید.

d) ترمولیزین (۰/۵ mg/mL) : به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در دمای ۴ °C انکوبه کنید.

۸- جداسازی اپیدرم را با دقت بررسی کنید. وقتی که اولین جداسازی اپیدرم در لبه های پوست قابل مشاهده شد، نمونه های پوست را در پتری دیش های ۱۰۰ mm(درم به سمت پایین باشد) قرار داده و با ۵ mL محیط کشت کامل به همراه سرم شستشو دهید.

۹- توسط دو عدد پنس خمیده، اپیدرم را کنده و آن را در یک لوله سانتریفوژ ۵۰ mL حاوی ۲۰ mL از محیط کشت کامل جمع آوری کنید.

a) وقتی که جداسازی توسط تریپسین انجام شده باشد، کراتینوسیت های زنده با پی پتینگ ملایم از قسمت های اپیدرمی جدا شده و توسط گاز نایلونی دارای منافذ ۱۰۰ µm(صافی سلولی) غربال می شوند.

b) برای تهیه سلول های منفرد از اپیدرمی که توسط دیسپاز یا ترمولیزین جداسازی شده است به انکوباسیون اضافی با تریپسین و EDTA (به ترتیب ٪۰/۲ و ٪ ۰/۰۵) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C نیاز می باشد.

۱۰- بعد از جداسازی پوست در تریپسین، به ملایمت سلول های اپیدرمی که به طور سست به قسمت درم باقیمانده متصل می باشند را تراشیده و سلول ها را به سوسپانسیون اپیدرمی اضافه کنید. در صورتی که خلوص جمعیت کراتینوسیت خیلی مهم نباشد این کار منجر به افزایشراندمان سلول می شود اما میزان آلودگی سلول های مزانشیمال در کشت های کراتینوسیت بدست آمده را به میزان زیادی افزایش می دهد.

۱۱- سلول های اپیدرمی جدا شده را با سانتریفوژ کردن در ۱۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، دو بار در محیط کشت شستشو داده و تعداد کل سلول ها و سلول های زنده (آنهایی که تریپان بلو را جذب نکرده اند) را شمارش کنید.

کشت اولیه:

۱۲- سلول ها را در محیط کشت های FAD یا KGM در دمای ۳۷ °C با دانسیته مورد نظر بذرافشانی کنید:

a) در FAD با سلول های تغذیه کننده (دیش ها ۳ روز قبل با سلول های 3T3 که پس میتوزی هستند یا با فیبروبلاست های پوستی بذرافشانی شده اند) کراتینوسیت ها را با دانسیته $۲-۵ \times ۱۰^{۴}$ cells/cm^2 بذرافشانی کنید.

b) برای کشت های فاقد فیبروبلاست، کراتینوسیت های اولیه را با دانسیته بالا ($۱-۵ \times ۱۰^{۵}$ cells/cm^2) در FAD بذرافشانی کرده و آنها را در دانسیته بالا در واکشت نگهداری کنید.

c) همچنین می توان سلول ها رادر دانسیته پایین (۱×۱۰^{۳} cells/cm^2) و دانسیته بالا(۵×۱۰^{۴} cells/cm^2) در KGM در غلظت کم Ca^{2+} (۰/۰۳-۰/۱ mM) بذرافشانی کرده و در محیط کشت مشابه واکشت داد.

در SKDM ، سلول ها به میزان کمتر چسبیده و رشد خواهند کرد بنابراین این محیط کشت برای شرایط آزمایشگاهی که فعالیت های تکثیری پایین مورد نیاز است توصیه می شود.

۱۳- وقتی سلول ها چسبیدند (بعد از ۳-۱ روز) کشت ها را به میزان زیادی با محیط کشت شستشو داده تا سلول های مرده و نچسبیده و سلول های تمایز یافته برطرف شده و کشت را در FAD یا KGM ادامه دهید. لایه لایه شدن و کاهش رشد می تواند با تغییر غلظت Ca^{2+} در KGM ایجاد شود.

واکشت:

۱۴- به صورت زیر واکشت دهید:

a) کشت های موجود در FAD :

i) به مدت ۱۵-۵ دقیقه در EDTA ٪ ۰/۱ -۰/۰۵ انکوبه کرده تا جداسازی سلولی آغاز شود که این حالت با افزایش فضاهای بین سلولی قابل مشاهده است.

ii) در تریپسین ٪ ۰/۱ و (٪۰/۰۵) ۱/۳ mM EDTA در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۰-۵ دقیقه انکوبه کرده و سپس به آرامی پی پتینگ کرده تا سلول ها کاملاً جدا شوند.

b) کشت های موجود در KGM:

i) به دلیل غلظت کم Ca^{2+} به تیمار اولیه با EDTA نیاز نمی باشد.

ii) همانند کشت در FAD در تریپسین٪ ۰/۱ با EDTA ۱/۳ mM انکوبه کنید.

منجمد نگهداری:

۱۵- اغلب، منجمد نگهداری برای نگهداری مقادیر زیاد سلول هایی که از یک بافت یکسان منشأ گرفته اند مورد نیاز می باشد و بهترین نتایج زمانی گزارش شده است که سلول ها از کشت های اولیه قبل از حالت تراکم استفاده شده اند.

a) سلول ها را مطابق قبل تریپسینه کرده و در ۱۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کنید.

b) سلول ها را مجدداً در محیط کشت کامل حاوی سرم به حالت تعلیق درآورده و آنها را شمارش کنید.

c) مقادیر ۲×۱۰^{۶} cells/mL در محیط کشت FAD با FCS ٪۲۰ و ٪۱۰ گلیسرول را در لوله های منجمد نگهداری توزیع کنید.

d) در دمای ۴°C به مدت ۲-۱ ساعت به حالت تعادل در آورید.

e) سلول ها را با دستگاه فریزر قابل برنامه ریزی به میزان سردکنندگی ۱°C در دقیقه فریزر کنید.

f) برای بازیابی سلول ها:

i) لوله های فریزر شده را به سرعت در حمام آب ۳۷ °C ذوب کنید.

ii) سلول ها را با محیط کشت ۱۰ برابر رقیق کنید.

iii) سلول ها را سانتریفوژ کرده و آنها را مجدداً در غلظت مورد نظر در محیط کشت مناسب به حالت تعلیق درآورید و در فلاسک کشت بذرافشانی کنید.

سلول های انسان و موش در هر سه نوع محیط کشت به مدت چندین ماه قادر به رشد می باشند. در حالیکه سلولهای موش را فقط یک یا دو بار می توان واکشت داد، سلول های انسانی را می توان پنج و هفت بار به ترتیب در محیط های کشت FAD و KGM واکشت داد.

تعیین هویت کشت های کراتینوسیت: سلول های کشت داده شده باید از لحاظ فنوتیپ اپیدرمی (اپی تلیال) بررسی شوند تا از آلودگی آنها با سلول های مزانشیمال جلوگیری شود. این کار را می توان به بهترین صورت با استفاده از آنتی بادی های مخصوص سیتوکراتین برای سلول های اپی تلیال انجام داد. سلول های اندوتلیال آلوده کننده را می توان توسط آنتی بادی های ضد CD31 یا آنتی ژن مربوط به فاکتور VIII مشخص کرد. تشخیص فیبروبلاست ها مشکل است، چون استفاده از آنتی بادی ها بر ضد ویمنتین غیر اختصاصی می باشد. در *in vitro* کراتینوسیت ها ممکن است شروع به ساخت ویمنتین کنند که مقدار آن وابسته به شرایط کشت می باشد. به عنوان یک آزمایش عملی برای آلودگی سلول های مزانشیمال، باید سلول ها در دانسیته های کلونال($۱-۵ \times ۱۰^{۲}$ cells/cm^2) بر روی سلول های تغذیه کننده کشت شوند. مورفولوژی کلون باید بعد از تثبیت و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) کشت های ۱۴-۱۰ روزه با بزرگنمایی کم مشخص شود. یک روش اختصاصی تر و حساستر برای تشخیص فیبروبلاست های آلوده کننده، آنالیز بیان فاکتور رشد کراتینوسیت (KGF) توسط RT-PCR می باشد. چون این فاکتور در فیبروبلاست ها تولید شده اما در کراتینوسیت ها تولید نمی شود، یک مارکر انتخابی می باشد. به علاوه بیان KGF با کشت همزمان افزایش می یابد

به طوری که در این آزمایش حداقل فیبروبلاست های آلوده کننده قابل آشکار سازی خواهند بود.

تغییرات: کراتینوسیت ها را می توان از پوشش ریشه بیرونی فولیکول (outer root sheaths:ORSs) موهای کنده شده به دست آورد. از ۳ فولیکول مو تا $10^3 \times 5$ سلول می توان به دست آورد و کشت آنها بر روی سلول های تغذیه کننده فیبروبلاست منجر به تولید تقریباً 1×10^6 سلول در عرض ۱۵ روز می شود. همانند کراتینوسیت های داخل فولیکولی، سلول های ORS را می توان بر روی دیش های دارای لایه تغذیه کننده واکشت داد و در حالت انجماد نگهداری کرد. کراتینوسیت هایی که از ORS سرچشمه می گیرند از لحاظ کشت، مشابه سلول های داخل فولیکولی بوده، وقتی به موش nude پیوند زده شوند تولید یک اپیدرم جدید را کرده و در پزشکی برای پوشش زخم های مزمن استفاده می شوند.

همچنین کراتینوسیت ها را می توان برای مطالعه جمعیت های سلولی کلونال و پتانسیل های تکثیری مختلف در دانسیته کلونال رشد داد. برای این منظور کراتینوسیت ها با سلول های 3T3 که با اشعه X پرتوتابی شده اند در غلظت های کاهش یافته Ca^{2+} در محیط کشت شرطی فیبروبلاست (fibroblast conditioned medium) یا در محیط کشت بدون سرم تعریف شده کشت همزمان می شوند.

به منظور ایجاد شرایط بیشتر مشابه با *in vivo* وبه منظور مطالعه تنظیم فیزیولوژی پوست توسط برهمکنش های اپی تلیال - مزانشیمال، سیستم های کشت همزمان ارگانوتایپیک با بذرافشانی سلول ها روی ژل های کلاژن(که با فیبروبلاست ها آلوده شده اند) یا قطعاتی از پوست و بالا آوردن تکیه گاهها تا سطح هوا- محیط کشت توسعه پیدا کرده است. تحت این شرایط رشد توسعه یافته، کراتینوسیت ها بسیاری از خصوصیات رشد و تمایز اپیدرم در *in vivo* شامل ویژگی های فراساختمانی و یک غشای زیرین کامل را بیان می کنند که این حالت در کشت های غوطه ور بر روی پلاستیک وجود نداشته و یا کمتر مشخص می شود. همچنین اکنون چنین کشت های ارگانوتایپیک را می توان ایجاد کرد و به مدت ۳ هفته در محیط کشت تعریف شده SKDM نگهداری کرد که این امر اجازه می دهد بر همکنش های مولکولی بین سلول های اپی تلیال و مزانشیمال را بدون مزاحمت سرم یا عصاره ای بافت نامشخص دیگر تجزیه و تحلیل کرد.

همچنین این گونه کشت های ارگانوتایپیک کراتینوسیت به صورت تجاری هم به صورت کشت توأم با فیبروبلاست ها یا کشت تکی کراتینوسیت های رشد یافته بر روی فیلترهای پلی کربنات موجود می باشد و به طور فزاینده برای آزمایشات توکسیسیتی و سازگاری زیستی (biocompatibility) در *in vivo* برای محصولات پوستی استفاده می شود.

رشد و تمایز بهینه کراتینوسیت های جدا شده تحت شرایط *in vivo* با پیوند سلول ها در موش های nude به صورت کشت های دست نخورده یا به صورت سوسپانسیون، به دست می آید. این کار باعث یک بیان تقریباً پیچیده از سلول ها، ویژگی های تمایزی اپیدرم طبیعی و همه جنبه های بیوشیمیایی و فراساختمانی اپی تلیوم کاملاً کراتینه به انضمام تشکیل یک غشاء زیرین می شود. کشت های ترکیب شده اپیدرم و استروما که روی فیلترهای مشبک سوار شده است، اکنون به صورت تجاری موجود بوده و به عنوان مدل هایی برای تحقیقات حساسیت (irritation) و التهاب پیشنهاد می شود.

قرنیه

تلاش هایی برای جایگزینی آزمایش چشم خرگوش (rabbit's eye test) با استفاده از اپی تلیوم قرنیه کشت داده شده وجود دارد، به گونه ای که کشت قرنیه اخیراً به شدت مورد توجه قرار گرفته است. دستور کار زیر برای کشت سلول های قرنیه انسان طبیعی در یک محیط کشت بدون سرم می باشد.

اپی تلیوم قرنیه به صورت مستقیم با محیط بیرون در تماس بوده و اولین بافت در معرض خطر در آسیب چشمی می باشد. مدل های حیوانی اغلب برای الگوسازی سطح چشم انسان استفاده می شوند. سیستم شرح داده شده برای بررسی های سمیت شناسی در *in vitro* توسعه یافته است که می تواند مطالعات *in vivo* را تکمیل کند.

اپی تلیوم قرنیه در *in vivo* با انتشار لایه نازکی از اشک اکسیژنه می شود و همچنین همیشه در حال تقسیم میتوز می باشد. این دو ویژگی به همراه فراهم بودن بافت قرنیه اهدایی، اپی تلیوم قرنیه را به عنوان یک ماده آغازگر مناسب برای تولید کشت های اولیه تبدیل کرده است.

سیستم بانک چشم که قرنیه اهدایی برای پیوند را فراهم می سازد از منابع مناسب برای کسب بافت قرنیه می باشد. بافت بانک چشم به دلیل میزان زیستایی محدود لایه سلولی اندوتلیال در *in vitro* ، بعد از سه روز ذخیره سازی کیفیت خود را از دست داده و در اختیار محققان می باشد. در حالی که اندوتلیوم ناپایدار است، اپی تلیوم ظرفیت تولیدی خود را در هنگام ذخیره سازی در دمای$^{\circ}C$ ۴ حفظ کرده و بافت منقضی شده را به عنوان یک منبع اپی تلیوم زنده تبدیل می کند.

دستور کار۲-۱۵- سلول های اپی تلیوم قرنیه

طرح کلی

بافت قرنیه بر روی کلاژن قرار داده شده و اجازه داده می شود که چسبیده و برون رشد (outgrowth) در محیط

کشت فاقد سرم بر روی سطوح پوشیده شده با فیبرونکتین – کلاژن توسعه یافته و زیاد شود.

مواد

استریل یا تهیه شده در شرایط آسپتیک:

محیط کشت بدون سرم کراتینوسیت (KGM) حاوی ۰/۱۵ mM کلسیم، فاکتور رشد اپیدرمی انسان(۰/۱ ng/mL) ، انسولین (۵ µg/mL) ، هیدروکورتیزون (۰/۵ µg/mL) و عصاره هیپوفیز گاوی (۳۰ µg/mL)

محیط کشت Eagle's Minimal Essential Medium

D-PBSA

FBS

تریپسین – EDTA: تریپسین ۰/۰۵٪، EDTA ۰/۵ mM

فیبرونکتین/کلاژن (FNC): این محلول شامل ۱۰µg/mL فیبرونکتین و ۳۵ µg/mL کلاژن می باشد که ۱۰۰ µg/mL آلبومین سرم گاو (BSA) به عنوان تثبیت کننده به آن اضافه می شود.

پلیت شش خانه دارای پوشش زیستی (biocoat) کلاژن نوع I دم رت

دستور کار

کشت های اولیه:

۱- اپی تلیال قرنیه های اهدایی را در جهت بالا بر روی یک سطح استریل قرار داده و آنها را با استفاده از یک اسکالپل به ۱۲ قسمت سه گوش بریده و از هر گونه حرکت برشی اجتناب کنید. دستکاری دقیق قرنیه به این طریق آسیب به ماتریکس کلاژن استروما را کاهش داده و آزادسازی فیبروبلاست ها را به حداقل می رساند.

۲- هر تکه از اپی تلیال قرنیه را به سمت پایین چرخانده و چهار تکه را در هر چاهک از سینی شش خانه قرار دهید.

۳- با پنس هر تکه را به آرامی فشار داده تا مطمئن شویم که تماس خوبی میان بافت و سطح کشت بافت وجود دارد. اجازه دهید که بافت به مدت ۲۰ دقیقه بخشکد.

۴- یک قطره از محیط کشت بدون سرم کراتینوسیت را با دقت بر روی هر تکه قرار داده و کشت را در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO_2 انکوبه کنید. هرچند قرنیه هایی که از بافت چشم دریافت شده است در محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک (یا McCarey-Kauffman یا Dexsol) نگه داری می شوند، تمام کارها تحت شرایط بدون آنتی بیوتیک انجام می شود.

۵- روز بعد ۱ mL KGM به هر چاهک اضافه می شود. با استفاده از یک محیط کشت بدون سرم و دارای کلسیم کم (۰/۱۵ mM) رشد فیبروبلاست ها و شکست ماتریکس کلاژن به حداقل می رسد.

۶- تکه بافت را ۵ روز بعد از کشت تکه قرنیه دهنده با پنس خارج کرده و ۳ mL محیط کشت اضافه کنید. بعد از خارج کردن بافت دهنده، سلول های چسبنده شروع به تکثیر کرده و در عرض ۲ هفته از زمان ایجاد کشت، تک لایه های متراکم تشکیل می شود که مورفولوژی سنگفرشی (Cobblestone) به همراه اپی تلیوم را نمایش می دهند. بازده، تقریباً $۱۰^۶$ × ۵-۱ سلول به ازای هر قرنیه می باشد.

تکثیر:

۷-بعد از دوره رشد اولیه، کشت را دو بار در هفته غذادهی کنید.

۸-در ٪ ۸۰-۷۰ تراکم، سلول ها را با D-PBSA شستشو داده و توسط تریپسین EDTA به مدت ۴ دقیقه در دمای ۳۷ °C آنها را آزاد کنید.

۹- واکنش را با ٪۱۰ FBS در D-PBSA متوقف کنید.

۱۰- سلول ها را شستشو داده (ابتدا سانتریفوژ کرده و مجدداً در KGM به حالت تعلیق در آورید)، آنها را شمارش کرده و با دانسیته $۱۰^۴$ × ۱ cells/cm^2 بر روی سطوح کشت بافت که با FNC پوشش داده شده اند، کشت دهید.

۱۱- کشت را در دمای ۳۷ °C در ٪۹۵ هوا و ٪۵ CO_2 انکوبه کنید.

۱۲- محیط کشت را یک روز بعد از تریپسینه کردن و بذرافشانی مجدد با محیط کشت تازه تعویض کنید.

سلول ها بلافاصله پس از پاساژ، بیشتر دوکی شکل به نظر می رسند، قابل انکسار (refractile) بوده و به میزان زیادی مهاجر می باشند. در طی ۷ روز کشت های کنترل ٪۸۰-۷۰ متراکم شده و شکل سنگفرشی از خود نمایش داده و اگر اجازه داده شود که به بیش تراکم (postconfluent) برسند، توانایی لایه لایه شدن در نواحی مجزا را حفظ می کنند.

هرچند کشت های اپی تلیال قرنیه را می توان تا ۵ بار (تقریباً ۱۰-۹ دو برابر شدن جمعیت) واکشت داد، اغلب تکثیر بین پاساژهای اول و سوم صورت می پذیرد. راندمان تقریبی $۱۰^۶$ × ۲-۱ سلول/ قرنیه می باشد. همیشه پیری تا پاساژ پنجم روی می دهد.

توسعه رده های سلولی پیوسته: رده های اپی تلیوم قرنیه انسان (Human Corneal Epithelium: HCE) با طول عمر طولانی توسعه یافته است تا یک منبع بزرگ از سلول ها را برای مقاصد آزمایشی فراهم سازد.

ذخیره سازی طولانی مدت سلول ها: سلول ها را می توان در نیتروژن مایع به حالت منجمد ذخیره نمود.

توسعه فنوتیپی در *in vitro* : هم کشت های اولیه و هم رده هایHCE خصوصیات فنوتیپی اپی تلیوم قرنیه در *in situ* را حفظ می کنند. آنها به ساخت کلاژناز ادامه داده و گیرنده های EGF و سیتوکین های مخصوص قرنیه را بیان

می کنند. هر چند سطح بیان در شرایط کشت متداول، کمتر از مقداری است که در *in situ* مشاهده می شود. وقتی اپی تلیوم قرنیه بر روی غشاهای کلاژن در سطح مشترک مایع- هوا کشت شود، ریخت شناسی و عملکرد دیواره نسبتاً به خوبی حفظ می شود. غشاهای مطبقی بوجود آمده که قادر به ممانعت از انتشار Na – فلورسین می باشند. کشت های سطح مشترک هوا-مایع تا ۲ هفته در *in vivo* زنده مانده و برای بررسی مکانیسم های آسیب و ترمیم استفاده می شود.

سلول های اپی تلیال قرنیه انسانی که در *in vitro* تکثیر یافته اند ممکن است یک الگوی مناسب برای کشف مکانیسم های پایه زیست شناختی سلول و همچنین پدیده های سمیت شناسی باشد. هرچند کشت های اولیه برای مطالعات *in vitro* کافی می باشد، رده های HCE با طول عمر توسعه یافته یک منبع مطمئنی از مواد را فراهم ساخته که می تواند بین آزمایشگاه ها رد و بدل شود.

سینه

شیر و نمونه های جراحی پلاستیک سینه منابع مناسبی از اپی تلیوم مجرای طبیعی سینه می باشند. استفاده از شیر منجر به کشت های خالص تری از سلول های اپی تلیال می شود. تفکیک در کلاژناز برای تفکیک اولیه ترجیح داده می شود. رشد بر روی لایه های تغذیه کننده متراکم روده جنین انسان از آلودگی استرومایی هر دو بافت طبیعی و بدخیم جلوگیری کرده و بهینه سازی محیط کشت، پاساژ سریال و کلونینگ سلول های اپی تلیال را مقدور می سازد. کشت در ژل کلاژن اجازه می دهد که ساختمان های سه بعدی تشکیل شود که به خوبی با بافت شناسی بافت دهنده اصلی مربوط می باشد.

سم کلرا و EGF همانند اپیدرم، رشد سلول های اپی تلوئید بافت سینه طبیعی را در *in vitro* تحریک می کند. الگوی هورمونی مناسب بسیار پیچیده می باشد. بسیاری از سلول های اپی تلیال با افزودن انسولین (IU/mL ۱۰-۱) و هیدروکورتیزون (M $^{-۸}$ ۱۰× ۱ ~) به محیط کشت، بهتر زنده می مانند. تمایز اپی تلیوم آکینار سینه در کشت اندام به هیدروکورتیزون، انسولین و پرولاکتین نیاز داشته و همچنین نشان داده شده است که استروژن، پروژسترون و هورمون رشد در کشت سلولی مورد نیاز می باشند.

شیر ابتدای شیر دهی یا بعد از شیر گرفتن بالاترین محصول سلولی را داشته و حاوی توده هایی از اپی تلیوم می باشد که می توانند در کشت تکثیر شوند. کشت های اولیه که بر روی یک محیط کشت حاوی سرم انسانی که با هورمون تکمیل شده است، رده های سلولی دارای طول عمر محدود را بوجود می آورد اما آنها کلونوژنیک هستند. این رده ها نهایتاً مغلوب سلول های غیر اپی تلیال شیر می شوند.

دستور کار۳-۱۵- اپی تلیوم پستان

طرح کلی

سلول های سانتریفوژ شده از شیر ابتدای شیردهی در حضور ماکروفاژهای درونی (endogenous) در یک محیط کشت غنی شده رشد می یابند و ممکن است با یک محلول شلاته کننده پروتئاز مخلوط واکشت داده شوند.

مواد

استریل:

محیط کشت رشد RPMI 1640

FBS

سرم انسانی (HuS)

دیش های پلاستیکی ۵ cm

ظرف یونیورسال یا لوله های سانتریفوژ ۵۰-۲۰ mL

محلول های استوک:

a)انسولین ۱ mg/mL در ۶ mM HCL

b)هیدروکورتیزون ۰/۵ mg/mL در محلول فیزیولوژیک

c)سم کلرا ۵۰ µg/mL در محلول فیزیولوژیک

نکته) سرم و محلول های استوک انسولین، هیدروکورتیزون، سم کلرا، پانکراتین و تریپسین باید در دمای ۲۰°C- نگهداری شوند.

محلول تریپسینه کننده (TEGPED):

a) EGTA (ethylene glycol – bis –(β- amino ethylether)-N,N,N′,N′-tetraacetic acid)، ۱۳mM در D-PBSA ۱۰mL

b) EDTA (diamino ethane tetraacetic acid)، ۷ mM در D-PBSA ۴mL

c) تریپسین ٪ ۰/۲ در HBSS ۴mL

d) پانکراتین ٪۱ در HBSS ۲mL

محیط کشت رشد:

RPMI 1640 حاوی ٪۱۵ FCS، ٪۱۰ HuS، سم کلرا ۵۰ ng/mL، هیدروکورتیزون ۰/۵ µg/mL، انسولین ۱ µg/mL

دیش های پلاستیکی ۵ cm یا فلاسک های ۲۵ cm^2

ظروف یونیورسال یا لوله های سانتریفوژ ۲۰ تا ۵۰ mL

دستور کار

شیر(۷-۲ روز پس از وضع حمل) می تواند به بهترین صورت از بخش های بیمارستان جمع آوری شود. سینه را با آب استریل پاک کرده و با دست شیر را در یک ظرف استریل می دوشیم. معمولاً ۲۰-۵ mL شیر از هر بیمار به دست می آید. شیرها مخلوط شده و با محیط کشت PRMI 1640 به نسبت ۱:۱ رقیق شده تا سانتریفوژ آن آسانتر شود.

کشت های اولیه:

۱-شیر رقیق شده را به مدت ۲۰ دقیقه در g ۱۰۰۰-۶۰۰ اسپین کنید. با دقت سوپرناتانت را خارج کرده، مقداری از مایع را باقی گذاشته تا رسوب پخش نشود.

۲-سلول های رسوب یافته را دو تا چهار بار با RPMI حاوی ٪ ۵ FCS شستشو داده تا زمانی که دیگر سوپرناتانت کدر نشود.

۳-مجدداً سلول ها را در محیط کشت به حالت تعلیق درآورده و ۵۰ μL از سلول ها را در دیش های ۵ cm در ۶ mL محیط کشت رشد کشت دهید. کشت ها را در دمای ۳۷ °C در CO_2 ٪۵ انکوبه کنید.

۴-محیط کشت را بعد از ۵-۳ روز و پس از آن هفته ای دو بار تعویض کنید. کلنی ها در حدود ۸-۶ روز بعد ظاهر شده و سپس توسعه یافته و ماکروفاژهای شیر را که در ابتدا به عنوان تغذیه کننده ها عمل می کنند خارج می سازند.

واکشت سلول های شیر:

۵-سلول ها را در TEGPED (۱/۵ mL در هر پلیت ۵ cm) در دمای ۳۷ °C به مدت ۱۵-۵ دقیقه، بر حسب سن کشت انکوبه کرده تا یک سوسپانسیون تک سلولی تولید شود.

۶-سلول ها را در ۱۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و مجدداً در ۶ mL محیط کشت به حالت تعلیق در آورید.

۷-سوسپانسیون را به اندازه ۲ mL در هر یک از سه دیش ۵ cm جدید یا فلاسک های ۲۵ cm^2 تقسیم کنید.

۸-با افزودن ۴mL محیط کشت تازه آن را سه برابر رقیق کنید.

تغییرات:

استفاده از ماکروفاژهایی که در شیر هستند به عنوان تغذیه کننده ها مناسب بوده اما آنها به تدریج که کلنی های اپی تلیال رشد می یابند، از دست می روند. هر چند می توان ماکروفاژها را توسط جذب با شیشه خارج کرد و در این صورت باید از سلول های تغذیه کننده دیگری استفاده کرد. سلول های 3T6 پرتوتابی شده یا تیمار شده با میتومایسین، بهترین فعالیت رشد را دارند. آنالوگهای cAMP را می توان به جای سم کلرا استفاده کرد هرچند این کار در مورد ماکروفاژهای تغذیه کننده امکان پذیر نمی باشد چون توسط آنالوگها کشته می شوند.

استفاده ها و کاربردهای کشت سلول اپی تلیال شیر: در کشت های شیر، سلول ها از غده کاملاً در حال فعالیت بدست آمده و امکان تعیین فنوتیپ ها توسط مارکرهای ایمنولوژیکی فراهم می باشد. سلول های شیر به طور موفقیت آمیزی توسط ویروس SV40 ترانسفورم شده اند و در مطالعات ژنوتوکسیسیتی استفاده می شوند.

دهانه رحم (Cervix)

کراتینوسیت های گردنه رحم را می توان در کشت سریال در دانسیته کلونال با استفاده از یک تغییر در روش شرح داده شده برای کراتینوسیت های اپیدرمی رشد داد.

دستور کار۴-۱۵- اپی تلیوم دهانه رحم

طرح کلی

سوسپانسیون های تک سلولی از اپی تلیوم بیوپسی های گردنه رحم که به طریق آنزیمی تهیه شده است را در داخل فلاسک ها یا پلیت ها به همراه سلول های 3T3 سوئیسی که به طور مرگ آوری غیر فعال شده اند تلقیح کرده در یک محیط کشت که با سرم و فاکتور رشد تکمیل شده است (دستور کار A) یا در محیط کشت رشد کراتینوسیت فاقد سرم (KGM) بدون حمایت تغذیه کننده با استفاده از تغییر روش کراتینوسیت های اپیدرمی رشد داده می شوند. وقتی که کلنی های کراتینوسیت تشکیل شده حاوی ۱۰۰۰ سلول یا بیشتر باشند می توان کشت ها را تریپسینه کرده و دوباره با استفاده از حمایت فیبروبلاست تغذیه کننده پاساژ داد.

مواد

استریل:

محیط کشت انتقال: DMEM که با ٪۱۰ FCS، ۱۰۰ μg/mL سولفات جنتامایسین و ۱۰ μg/mL آمفوتریسین تکمیل شده است.

محلول تریپسین- EDTA برای تفکیک سلول های اپی تلیال : ٪ ۰/۲۵ تریپسین(v/v) و EDTA (٪ ۰/۰۱) ۰/۲۵ mM به صورت نمک دی سدیم با pH ۷/۴ در D -PBSA

محیط کشت برای دستور کار A : محیط کشت رشد کراتینوسیت (KCM) :DMEM که با FCS ٪۱۰، ۰/۵ μg/mL هیدروکورتیزون و 1×10^{-10} M سم کلرا تکمیل شده است.

a FBS: همه بچ ها رشد را به یک میزان تقویت نمی کنند. نمونه های سرم باید آزمایش شوند و یک بچ بزرگ با کیفیت مناسب خریداری شود.

b فاکتور رشد اپیدرمی (EGF): ۱۰۰ μg از آن در 1mL از UPW استریل حل شود. آن را در مقادیر ۱۰۰μL توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- نگهداری کنید. استوک های کار را با رقیق کردن ۱۰۰μL EGF با غلظت ۱۰۰ μg/mL در ۱۰mL محیط کشت حاوی سرم تهیه کنید و در دمای ۴ °C ذخیره شود. به منظور استفاده آن را به نسبت ۱:۱۰۰

با محیط کشت حاوی سرم در یک غلظت نهایی ۱۰ ng/mL رقیق کنید.

c سم کلرا (CT) : ۱/۱۸ mL از UPW استریل را به ۱ mg سم کلرا اضافه کرده تا یک محلول M 10^{-5} بدست آید. در دمای ۴+ °C ذخیره شود. استوک های کار را با وارد کردن ۱۰۰ µL از محلول M 10^{-5} در ۱۰ mL محیط کشت حاوی سرم تهیه کنید. توسط فیلتر کشت را استریل کرده در دمای ۴+ °C نگهداری کنید. در غلظت نهایی M 10^{-10} استفاده شود.

d هیدروکورتیزون: ۱mg هیدروکورتیزون را در ۱mL اتانول ۵۰٪ در آب (v/v) حل کنید. سپس آن را در مقادیر ۱۰۰ µL توزیع کرده و در دمای ۲۰- °C نگهداری کنید. در غلظت نهایی ۰/۵ µg/mL استفاده شود.

محیط کشت برای دستور کار B: محیط کشت رشد کراتینوسیت: KGM (Bio-Whittaker) یا کراتینوسیت – SFM (Invitrogen)

پتری دیش های کشت بافت با قطرهای ۶ cm و ۹ cm

پنس دندان موشی (rat-toothed)

قیچی های خمیده (curved iris scissors)

اسکالپل های یک بار مصرف با شمار تیغه ۲۲

پی پت

لوله های سانتریفوژ

غیر استریل:

هموسیتومتر

منبع پرتوتابی (مثل پرتوهای X یا ^{60}Co)

فیبروبلاست های 3T3 سوئیسی (فقط دستور کار A)

a یک استوک اصلی از سلول ها باید تهیه شده و در آمپول های مجزا به میزان 1×10^{6} سلول منجمد شوند. سلول ها را نباید برای بیش از ۲۰ پاساژ استفاده کرد.

i سلول های 3T3 را در DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گاو در فلاسک های کشت بافت ۱۷۵ cm^2 کشت دهید. سلول ها را به میزان $1/5 \times 10^{4}$ cells/cm^2 تلقیح کنید. محیط کشت را بعد از ۲ روز تعویض کنید. هر ۵-۴ روز واکشت دهید.

ii برای جلوگیری از آلودگی های در سطح کم، یک فلاسک اصلی از سلول ها را روی محیط کشت بدون آنتی بیوتیک نگهداری کنید. سپس این سلول ها در هر پاساژ برای تلقیح فلاسک های مورد نیاز برای آن سلول های تغذیه کننده در آن هفته استفاده می شوند.

b لایه های تغذیه کننده با پرتودهی با ۶۰ Gy (۶۰۰۰ rad) ، از یک منبع اشعه X یا ^{60}Co غیر فعال می شوند. سلول های پرتودهی شد(XR-3T3) ممکن است به مدت ۴-۳ روز در دمای ۴ °C نگهداری شوند.

c در غیاب یک منبع پرتودهی، سلول های تغذیه کننده با میتومایسین C غیر فعال می شوند.

سلول های 3T3 را که به صورت تک لایه رشد کرده اند به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ °C در معرض ۴۰۰ µg/mL میتومایسین C قرار دهید.

i سلول های تیمار شده را تریپسینه کرده، مجدداً به حالت تعلیق در آورده و رسوب سلولی را دو بار با محیط کشت تازه حاوی سرم شستشو دهید وسپس سلول ها را در یک غلظت مناسب در محیط کشت کامل به حالت تعلیق درآورده و استفاده کنید.

دستور کار A : با لایه های تغذیه کننده 3T3

کشت اولیه:

۱-بیوپسی دهانه رحم را از محیط کشت انتقالی خارج کرده و سلول ها را دو تا سه مرتبه با ۵mL از D-PBSA استریل حاوی ۵۰ µg/mL سولفات جنتامایسین و ۵ µg/mL آمفوتریسین شستشو دهید.

۲-بیوپسی را به صورتی که سطح اپی تلیال آن به سمت پایین باشد روی یک دیش کشت استریل قرار دهید.

۳-با استفاده از یک اسکالپل یک بار مصرف دارای یک تیغ شماره ۲۲، تا حد امکان ماهیچه و استروما را بریده و بتراشید تا فقط یک لایه باریک اپی تلیال باقی بماند.

۴-لایه اپی تلیال را با استفاده از قیچی خمیده تکه تکه کنید.

۵-۱۰ mL تریپسین- EDTA (که تا حرارت ۳۷ °C گرم شده اند) را به تکه های اپی تلیال اضافه کرده و بافت را به یک ظرف شیشه ای حاوی یک دانه مغناطیسی که با پلاستیک پوشش داده شده است انتقال دهید.

۶-۱۰ mL-۵ دیگر تریپسین – EDTA اضافه کنید.

۷-ظرف را بر روی یک همزن مغناطیسی در داخل انکوباتور یا گرمخانه ۳۷ °C قرار داده تا به آهستگی به مدت ۴۰-۳۰ دقیقه همزده شود.

۸-اجازه دهید که سوسپانسیون در درجه حرارت اتاق به مدت ۳-۲ دقیقه بی حرکت بماند.

۹-سوپرناتانت حاوی سلول های منفرد را خارج کرده و توسط یک صافی از جنس فولاد ضد زنگ یا پلاستیک، آن را در یک لوله سانتریفوژ ۵۰ mL صاف کنید.

۱۰-۱۰ mL محیط کشت کامل به مایع فیلتر شده اضافه کنید.

۱۱-۱۵ mL دیگر از تریپسین -EDTA گرم به قطعات موجود در ظرف افزوده و مراحل ۹-۵ را دوبار تکرار کنید. تریپسین و سوپرناتانت را ترکیب کرده و سوسپانسیون را در یک سانتریفوژ رومیزی به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm (۸۰g) اسپین کنید.

۱۲- سوپرناتانت را خارج کرده، ۱۰ mL محیط کشت کامل به رسوب افزوده، سلول ها را به شدت به حالت تعلیق در آورده تا یک سوسپانسیون تک سلولی حاصل شود و

سلول ها را با یک هموسیتومتر شمارش کنید . میزان زیستایی سلولی را توسط تریپان بلو بررسی کنید.

۱۳- سوسپانسیون سلولی گردنه رحم را با KCM رقیق کرده و سلول ها را با دانسیته $۲×۱۰^۴$ cells/cm^2 به همراه $۱×۱۰^۵$ cells/cm^2 از سلول های 3T3 غیر فعال شده (یعنی $۱×۱۰^۵$ سلول گردنه رحمی، $۵×۱۰^۵$ سلول XR-3T3 در یک پتری دیش ۶ cm) کشت دهید.

۱۴- کشت ها را در دمای ۳۷ °C در CO_2 ۵٪ انکوبه کنید.

۱۵-هفتاد و دو ساعت بعد از شروع کشت، محیط کشت را با یک محیط کشت کامل که با EGF با غلظت ۱۰ng/mL تکمیل شده است، تعویض کنید. کشت ها را از لحاظ میکروسکوپی بررسی کرده تا مطمئن شوید که لایه تغذیه کننده کافی می باشد. در صورت نیاز سلول های تغذیه کننده بیشتری اضافه کنید.

۱۶-محیط کشت را هفته ای دو بار تعویض کنید؛ باید EGF در محیط کشت وجود داشته باشد به جز وقتی که سلول ها در ابتدا کشت می شوند. کلنی های کراتینوسیت از روز ۱۲-۸ در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده بود و از روز ۱۶-۴ باید توسط چشم غیر مسلح قابل مشاهده باشند. کشت ها را باید در این زمان پاساژ داد.

واکشت:

۱۷-محیط کشت را از لایه سلولی خارج کرده و سلول های تغذیه کننده را توسط شستشوی سریع با ٪ ۰/۰۱ EDTA خارج کنید. سپس دو بار با D-PBSA شستشو دهید.

۱۸-به هر دیش کشت مقدار کافی تریپسین/EDTA گرم اضافه کرده تا سطح سلولی پوشیده شود. کشت ها را تا زمانی که کراتینوسیت ها جدا شوند در دمای ۳۷ °C قرار دهید؛ جدا شدن سلولها را با میکروسکوپ بررسی کنید. سلول ها را برای مدت زمان بیشتر از ۲۰ دقیقه در تریپسین قرار ندهید.

۱۹-سوسپانسیون سلولی را از پلیت خارج کرده آن را به یک لوله سانتریفوژ استریل انتقال دهید.

۲۰- سطح رشد را با محیط کشت کامل شستشو داده و سپس آن را به سوسپانسیون اضافه کنید. سوسپانسیون را توسط یک پی پت ۱۰ mL مخلوط و توزیع کنید.

۲۱- سلول ها را به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm اسپین کنید.

۲۲- سوپرناتانت را خارج کرده، ۱۰mL محیط کشت کامل اضافه کرده و مجدداً سلول ها را توسط یک پی پت ۱۰ mL به شدت به حالت تعلیق درآورید تا یک سوسپانسیون تک سلولی به دست آید.

۲۳- سلول ها را با یک هموسیتومتر شمارش کنید.

۲۴- ممکن است سلول ها مجدداً بر روی سلول های 3T3 غیر فعال شده کشت داده شده و مطابق روش های قبلی رشد یابند یا می توان آنها را برای بازیافت بعدی منجمد کرد.

دستور کار B : محیط کشت بدون سرم

کشت اولیه:

۱-مراحل ۱۱-۱ دستور کار بالا را با لایه های تغذیه کننده 3T3 دنبال کرده تا یک سوسپانسیون تک سلولی در محیط تکمیل شده با سرم بدست آید.

۲-سوسپانسیون را به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm (۸۰ g) اسپین کنید. سوپرناتانت را خارج کرده و مجدداً سلول ها را در ۱۰mL D-PBSA به حالت تعلیق در آورید.

۳-دوباره سوسپانسیون را اسپین کرده و سلول ها را یک بار دیگر با D-PBSA شستشو دهید. مجدداً سلول ها را در ۱۰ mL محیط کشت رشد کراتینوسیت به حالت تعلیق در آورده و در دیش ها یا فلاسک های کشت با دانسیته $۲×۱۰^۵$ cells/cm^2 ($۱۰^۶$ سلول در یک پتری دیش ۵ cm)، $۴×۱۰^۶$ سلول در پتری دیش ۹ cm) بذرافشانی کنید.

۴-کشت را در دمای ۳۷ °C و CO_2 ۵٪ انکوبه کنید.

۵-محیط کشت را بعد از ۷۲ ساعت و بعد از آن هفته ای دو بار تعویض کنید. کشت ها در طی ۲۰-۱۴ روز متراکم شده و باید در آن زمان پاساژ داده شوند.

واکشت

۶-مراحل۲۳-۱۷ دستور کار A را دنبال کنید.

۷-سوسپانسیون را به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰g-۸۰ اسپین کنید. سوپرناتانت را خارج کرده و مجدداً سلول ها را در ۱۰ mL از D-PBSA به حالت تعلیق در آورید.

۸-دوباره سوسپانسیون را اسپین کرده و سلول ها را یک بار دیگر با D-PBSA شستشو دهید. مجدداً سلول ها را در KGM به حالت تعلیق در آورده و آنها را در داخل دیش های کشت در دانسیته $۱۰^۵$ cells/cm^2 ($۵ ×۱۰^۵$ سلول در پتری دیش ۵۰ mm و $۲×۱۰^۶$ سلول در پتری دیش ۹۰ mm) کشت دهید.

۹-همچنین ممکن است سلول ها در این مرحله برای بازیافت در مراحل بعدی منجمد شوند.

کراتینوسیت های دهانه رحم که مطابق روش های شرح داده شده رشد می یابند را می توان برای مقاصد مختلفی مثل تحقیقات سرطانزایی پاپیلوما ویروس، مطالعات تمایز و بررسی پاسخ این سلول ها به موتاژن ها و کارسینوژن ها استفاده کرد.

دستگاه معده ای روده ای (Gastrointestinal Tract)

کشت اپی تلیوم طبیعی پوشش روده زیاد گزارش نشده است، هرچند گزارش های متعددی در مورد رده های پیوسته از

کارسینومای کلون انسان وجود دارد. Ownes و همکاران توانستند سلول های روده جنین انسان را به صورت یک رده سلولی متناهی کشت دهند(FHS 74 Int) و استفاده وسیعی از رده سلولی IEC-6 مربوط به روده رت می شود.

آماده سازی نمونه های بافت برای کشت سلولی در ظرف ۲-۱ ساعت پس از برداشت از بیمار شروع می شود. اگر این کار امکان پذیر نباشد، برش بافت به قطعات کوچک (۲-۱ mm) توسط اسکالپل و ذخیره سازی شبانه در دمای ۴ °C در محیط کشت شستشو دهنده می تواند موفقیت آمیز باشد.

دستور کار۵-۱۵- جداسازی و کشت کریپت های کلون

طرح کلی

بافت کاملاً خرد شده، در کلاژناز و دیسپاز تفکیک شده و کریپت ها با رسوب در سوربیتول جداسازی می شوند.

مواد

استریل:

HBSS/PSG : محلول نمکی متعادل شده Hank با ۱۰۰ U/mL پنی سیلین، ۳۰ µg/mL استرپتومایسین و ۲۵ µg/mL جنتامایسین

مخلوط هضم: ۱۵۰ U/mL کلاژناز نوع XI ، ۴۰ µg/mL دیسپاز، ٪۱ FBS در DMEM

محیط کشت رشد: DMEM با ۲۵ mM گلوکز ، ۶/۸ mM پیروات، ۰/۲۵ U/mL انسولین، ۵۰ ng/mL EGF، ٪ ۲/۵ FBS و آنتی بیوتیک ها همانند HBSS در بالا که تا pH ۷/۴ با بی کربنات سدیم در ٪۷/۵ CO_2 بافری شده است.

S-DMEM : محیط کشت رشد با ٪۲ سوربیتول (۰/۱۱ M) که با فیلتراسیون استریل شده است.

همه محیط های کشت باید در دمای ۳۷ °C باشند.

پتری دیش های ۹ cm

ظروف یونیورسال یا لوله های سانتریفوژ ۵۰-۳۰ mL

پلیت های چاهک دار ۲۴ خانه که با کلاژن پوشش داده شده اند:

a) استوک Vitrogen را ده برابر رقیق کنید.

b) پلیت ها را با ۰/۵ mL در هر چاهک به مدت ۳ ساعت انکوبه کنید.

c) Vitrogen اضافی را خارج کرده و پلیت ها را در هود لامینار فلو خشک کنید.

فلاسک های ۲۵ cm^2

اسکالپل ، هولدر شماره ۴ ، تیغه شماره ۲۲

پی پت Movette (یا پی پت پلاستیکی دهانه گشاد مشابه)

دستور کار

جداسازی کریپت ها از کلون انسان:

۱-بافت باید برای کشت بلافاصله پس از برش از بیمار در DMEM قرار داده شود. مطالعات اولیه نشان می دهد از زمانی که بافت سریعاً در DMEM گذاشته می شود، دوره کوتاهی(تا ۲ ساعت) در دمای ۴°C مقاومت کرده هرچند زمان طولانی تری توصیه نمی شود.

۲-بافت کامل را دو بار در HBSS/PSG ×۱ شستشو داده تا هر گونه عوامل آلوده کننده برطرف شود.

۳-بافت را به یک پتری دیش تمیز دارای HBSS/PSG تازه انتقال دهید.

۴-تا حد امکان ماهیچه ها را زدوده و بافت را با دو اسکالپل به قطعات ریز خرد کنید.

۵-قطعات بافت خرد شده را با انتقال آنها به یک فلاسک ۲۵ cm^2 حاوی ۲۰ mL HBSS/PSG و پی پت کردن آنها با یک پی پت Movette شستشو دهید.

۶-اجازه دهید که محتویات فلاسک ته نشین شود و HBSS/PSG را خارج کنید.

۷-فرایند را تکرار کرده تا زمانی که تقریباً HBSS/PSG شفاف باقی بماند. این امر معمولاً پس از ۵ بار شستشو اتفاق می افتد.

۸-بافت را به یک پتری دیش انتقال داده و هر گونه HBSS/PSG اضافی را خارج کنید.

۹-بافت را با اسکالپل تکه تکه کرده تا به یک حالت نسبتاً یکنواخت برسد. بافت خرد شده را با یک پی پت دهان گشاد به یک فلاسک ۲۵ cm^2 انتقال دهید (مطمئن شوید که داخل پی پت با HBSS/PSG مرطوب شده تا از چسبندگی آن ممانعت شود).

۱۰-اجازه دهید که تکه ها ته نشین شوند و سپس HBSS/PSG اضافی را خارج کنید.

۱۱-۳۰-۲۵ mL مخلوط هضم اضافه کنید.

۱۲-در دمای ۳۷ °C به مدت ۱ ساعت انکوبه کنید.

۱۳-مخلوط هضم را جایگزین کنید:

a) اجازه دهید که بافت ته نشین شود.

b) با دقت مخلوط هضم را از فلاسک خارج کرده و آن را دور بریزید(مطمئن شوید که بافت هضم نشده را خارج نکنید).

c) مخلوط هضم تازه اضافه کرده و انکوباسیون را در دمای ۳۷°C به مدت ۲-۱ ساعت دیگر ادامه دهید.

dبافت را هر ۳۰-۱۵ دقیقه بررسی کرده تا مطمئن شوید که کریپت ها بیش از حد هضم نشوند. وقتی تقریباً ۸۰-۷۰ درصد از کریپت ها به صورت کریپت های آزاد تکی رها شدند، جداسازی کامل می باشد.

ته نشینی کریپت های کلونی انسان:

کریپت های رها شده توسط رسوب گذاری با سوربیتول خالص سازی می شوند. ممکن است توده های بزرگ بافت چربی/ مزانشیمال به بالای لوله رسوب گذاری بیاید؛ در مرحله اول باید این بافت دور ریخته شود زیرا ممکن است در طی فرایند رسوب گذاری باعث ایجاد مشکل شود.

۱۴- محتویات فلاسک هضم را بین دو ظرف یونیورسال ۳۰ mL تقسیم کرده و با نام مجموعه ۱ نامگذاری کنید.

۱۵-حجم را با S-DMEM به ۲۵ mL رسانده و هر گونه چربی شناور یا هر گونه بافت مزانشیمال دیگر را خارج کنید.

۱۶- اجازه دهید که محتویات لوله ها به مدت ۱ دقیقه ته نشست شده تا هر گونه ماده هضم نشده ای رسوب کند.

۱۷-هر گونه ماده چربی شناور در سطح را دور ریخته و سپس به ملایمت سوسپانسیون سوپرناتانت را از لوله ها خارج کرده و به دو لوله تمیز انتقال داده و به عنوان مجموعه ۲ نامگذاری کنید.

۱۸-اجازه دهید که محلول به مدت ۳۰ ثانیه ته نشین شود.

۱۹-محتویات را به یک مجموعه دیگر از لوله های تمیز به نام مجموعه ۳ انتقال دهید.

۲۰-با S-DMEM حجم را افزایش دهید.

۲۱-لوله های مجموعه ۳ را در g ۳۰۰-۲۰۰ به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ کنید.

۲۲-سوپرناتانت را دور بریزید.

۲۳-رسوب را با ضربه آهسته به ته لوله پراکنده کنید.

۲۴-یک بار دیگر کریپت ها را در S-DMEM به حالت تعلیق در آورده و مرحله سانتریفوژ را تکرار کنید. این مرحله شستشو و سانتریفوژ با S-DMEM باید ۵ مرتبه یا تا زمان شفاف شدن سوپرناتانت، تکرار شود.

۲۵-بقایای حاصل از لوله های مجموعه ۱ و۲ باید از لحاظ حضور کریپت ها به طور میکروسکوپی بررسی شوند. در صورتیکه نسبت بالایی از کریپت ها باقی مانده بود باید مواد، همزده شده و مرحله رسوب گذاری تکرار شود. اگر فقط مواد هضم نشده باقی مانده بود، می توان آنها را دور ریخت.

۲۶-وقتی سوپرناتانت شفاف شد، کریپت ها برای کشت آماده اند. یک دانسیته پلیتینگ بحرانی برای رشد کشت خوب، مورد نیاز می باشد. معمولاً وقتی کریپت ها در دانسیته ۱۰۰۰-۸۰۰ کریپت در هر میلی لیتر در هر چاهک از یک پلیت ۲۴ خانه کشت می شوند، به نظر می رسد که بهتر رشد می کنند.

برای تعیین تعداد کریپت ها جداسازی شده:

کریپت های جدا شده را در ۱۰mL از محیط کشت رشد به حالت تعلیق درآورده و آن را هم بزنید.

a) ۱۰۰ μL را برداشته و به ۹۰۰ μL محیط کشت رشد اضافه کنید.

b) ۱۰۰ μL از این نمونه برداشته و تعداد کریپت ها را شمارش کنید.

تعداد کریپت در میلی لیتر = تعداد کریپت های شمرده شده × ۱۰۰

۲۷- پلیت ها را در دمای ۳۷ °C در ۷/۵ ٪ CO_2 انکوبه کرده و به سلول ها اجازه دهید که به مدت ۲ روز بچسبند.

۲۸-محیط کشت حاوی تمام مواد نچسبیده را از پلیت ها خارج کرده و با محیط کشت جدید جایگزین کنید.

۲۹-در فواصل زمانی ۵ روز، محیط کشت را با ۰/۵ mL محیط کشت جدید تکمیل کنید.

کریپت ها را می توان بر روی پلیت های پوشیده شده با کلاژن یا لایه تغذیه کننده 3T3 کشت داد. این روش امکان کشت روتین در یک دوره در حدود ۱ هفته را فراهم می سازد. بعد از این مدت سلول های اپی تلیال رو به زوال رفته و فیبروبلاست های آلوده کننده غالب می شوند. کشت ها به خوبی واکشت نمی شوند. مواد زیادی برای بازیافت سلول ها استفاده شده اند اما تا کنون موفقیت اندکی برای واکشت دادن سلول های اپی تلیال روده بدست آمده است. فیبروبلاست را می توان کاملاً به آسانی واکشت داد و یک منبع بالقوه برای سلول های لایه تغذیه کننده می باشند.

کبد

هرچند کشت های حاصل از کبد بالغ همه خصوصیات پارانشیم کبد را بیان نمی کنند، در مورد این که رده صحیح سلولی ممکن است کشت شده باشد تردید کمی وجود دارد. تاکنون تلاش ها برای تولید رده های سلولی تکثیر شونده به طور کامل موفقیت آمیز نبوده است اما هپاتوسیت های عملکردی را می توان تحت شرایط صحیح کشت داد.

تعدادی از مفیدترین رده های سلولی کبدی پیوسته از هپاتوماهای Reuber H35 و Morris رت سرچشمه گرفته شده است. ثابت شده است که القاء تیروزین آمینوترانسفراز با دگزامتازون در این رده های سلولی، یک مدل ارزشمند برای مطالعه تنظیم سازگاری آنزیمی در سلول های پستانداران می باشد. همچنین رده های سلولی از قبیل Hep-G2 از هپاتومای انسانی، تولید شده و برخی از خواص متابولیزه کننده کبد طبیعی را حفظ کرده است.

وقتی که آنزیم های پروتئولیتیک مثل کلاژناز که نسبتاً غیر سمی می باشند از طریق رگ ها و مویرگ ها به کبد تزریق شوند، اگر قبلاً کبد از خون پاک شده باشد و با شستشو توسط بافر فاقد کلسیم، عاری از کلسیم شده باشد اتصالات بین سلولی شکسته شده و داربست ارتباطی در عرض ۱۵ دقیقه هضم خواهد شد. هپاتوسیت ها توسط دو یا سه سانتریفوژ افتراقی از سوسپانسیون سلولی انتخاب می شوند.

دستور کار۶-۱۵- جداسازی هپاتوسیت های رت

طرح کلی

یک کانولا را در سیاهرگ های کبدی وارد کرده، کبد را با یک بافر بدون کلسیم شستشو داده(۱۵ دقیقه)، محلول آنزیمی را به کبد تزریق کرده (۱۵ دقیقه) ، سلول ها را جمع آوری کرده و شستشو دهید و هپاتوسیت های زنده را شمارش کنید.

مواد

استریل:

محیط کشت L-15 leibovitz

محیط کشت Ham's F12 یا William's E که با ٪۰/۲ آلبومین گاوی (گرید V ، سیگما) و ۱۰ µg/mL انسولین گاوی غنی شده است(۱۰۰-۸۰ mL)

محیط کشت حداقل هپاتوسیت (HMM) : ٪ ۶۷/۵ Eagle's MEM ، ٪ ۲۲/۵ محیط کشت ۱۹۹ (یا William's E به جای هر دو)، ۵ µg/mL انسولین گاوی، BSA ۱ mg/mL ، ۲۰ mM پیروات ، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین ، ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین و ٪۲۰ FBS

HMM/SF : HMM بدون سرم با 1×10^{-5} M هیدروکورتیزون همی سوکسینات

بافر HEPES فاقد کلسیم pH ۷/۶۵ : NaCl ۱۶۰/۸ mM ؛ KCL ۳/۱۵ mM ، $Na_2HPO_4.12H_2O$ ۰/۷ mM ، HEPES ۳۳ mM که با فیلتر میلی پور ۰/۲۲ µm استریل شده و در دمای ۴ °C ذخیره می شود (۲ ماه).

محلول کلاژناز: ٪ ۰/۰۲۵ کلاژناز(سیگما گرید ۱ یا Roche ۱۰۳۵۷۸) ؛ $CaCl_2$ $.2H_2O$ ٪ ۰/۰۷۵ در بافر HEPES فاقد کلسیم pH ۷/۶۵ که با فیلتراسیون استریل شده و درست قبل از استفاده تهیه می شود.

Nembutal (٪۵ Abbot)

هپارین

لوله Tygone (OD ۵ mm و ID ۳ mm)

سوزن های تزریق سیاهرگی یک بار مصرف (۲۰ G)

نخ دوخت برای کانولاسیون

بطری های مدرج و پتری دیش

وسایل جراحی (قیچی ها و پنس های تند، مستقیم و خمیده و کلیپس)

سرنگ های یک بار مصرف ۱mL ، ۲عدد

غیر استریل:

زمان سنج

پمپ پریستالتیک (۲۰۰-۱۰ rpm)

حمام آب

دستور کار

۱-بافر شستشوی HEPES و محلول کلاژناز را در یک حمام آب گرم کنید(معمولاً حدود ۳۹-۳۸ °C تا در کبد به ۳۷ °C برسد).اکسیژن دهی لازم نمی باشد.

۲-میزان جریان پمپ را به میزان ۳۰ mL/min تنظیم کنید.

۳-با تزریق داخلی صفاقی Nembutal (۱۵۰µL / ۱۰۰ g) رت را بیهوش کرده و هپارین را به سیاهرگ رانی تزریق کنید.

۴-سطح پایینی رت را با الکل ٪۷۰ سواب کنید.

۵-شکم را باز کرده یک شریان بند را به صورت شل در اطراف سیاهرگ در تقریباً ۵ میلیمتری کبد بسته، کانولا را در کبد جایگزین کرده و رگ را مسدود کنید.

۶-سریعاً رگ های فرعی کبدی را بریده تا از فشار اضافی اجتناب شود . تزریق با ۵۰۰ mL از بافر HEPES فاقد کلسیم را به میزان جریان ۳۰ mL/min شروع کرده؛ بررسی کنید که کبد در عرض چند ثانیه سفید می شود.

۷-۳۰۰ mL از محلول کلاژناز را به میزان جریان ۱۵ mL/min به مدت ۲۰ دقیقه تزریق کنید. کبد متورم می شود.

۸-کبد را خارج کرده و آن را با بافر HEPES شستشو دهید.

۹-بعد از پاره کردن کپسول گیلسون، سلول ها را در ۱۰۰ mL محیط کشت L-15 leibovitz پراکنده کنید.

۱۰-سوسپانسیون را با استفاده از گاز دو لایه یا الک نایلونی ۸۰-۶۰ µm صاف کرده و اجازه دهید که سلول های زنده به مدت ۲۰ دقیقه ته نشین شوند(معمولاً در درجه حرارت اتاق) و سوپرناتانت (۶۰ mL) حاوی بقایای سلولی و سلول های مرده را خارج کنید.

۱۱- سلول ها را سه مرتبه با سانتریفوژ کردن آهسته (۵۰g به مدت ۴۰ ثانیه) شستشو داده تا کلاژناز، سلول های آسیب دیده و سلول های غیر پارانشیمی خارج شوند.

۱۲- هپاتوسیت های جدا شده را در HMM به حالت تعلیق در آورید.

۱۳- بعد از ۳-۲ ساعت، سلول های زنده به پلاستیک متصل شده وشروع به گسترش می کنند. سلول های مرده را با محیط کشت سوپرناتانت خارج کنید.

۱۴- بعد از اتصال سلولی، FBS را خارج کرده و محیط کشت را با HMM/SF تازه جایگزین کنید. پس از آن هر روز این کار را تکرار کنید.

زمانی که قالب زیستی (biomatrix) مناسب مانند فیبرونکتین، کلاژن یا ماتریژل (matrigel) برای پوشش دیش استفاده می شود، می توان به طور کامل از افزودن FBS اجتناب کرد.

تغییرات

جداسازی هپاتوسیت ها از گونه های دیگر: روش کار تزریق وریدی دو مرحله ای را می توان برای بدست آوردن هپاتوسیت ها از جوندگان مختلف شامل موش، خرگوش، خوکچه هندی یا موش خرمای کوهی آمریکای شمالی (wood-chuk) با وفق دادن حجم و میزان جریان محلول های تزریقی بر حسب اندازه کبد، استفاده کرد. تکنیک با تزریق کردن یک بخش از کل کبد(معمولاً با ۱/۵ لیتر بافر HEPES و یک لیتر محلول کلاژناز به ترتیب به میزان ۷۰ و ۳۰ میلی لیتر در دقیقه) یا با برداشت بیوپسی (بر حسب اندازه نمونه بافت، ۳۰-۱۵ میلی لیتر در دقیقه) برای کبد انسان سازگار شده است. جداسازی کامل به یک سوسپانسیون تک سلولی را می توان با یک انکوباسیون اضافی با کلاژناز در دمای ۳۷ °C و با همزنی آرام به مدت ۲۰-۱۰ (مخصوصاً برای کبد انسان)دقیقه بدست آورد. هپاتوسیت های ماهی را می توان با کانولاسیون سیاهرگ روده ای و سوراخ کردن قلب برای جلوگیری از فشار اضافی، بدست آورد. تزریق در درجه حرارت اتاق به میزان جریان ۱۲ mL/min انجام می شود.

نگهداری و تمایز: سلول های پارانشیمی جدا شده را می توان به مدت ۶-۴ ساعت به حالت سوسپانسیون نگهداری کرد و برای آزمایشات کوتاه مدت استفاده کرد. وقتی که سلول ها بر روی محیط کشت مغذی که با 1×10^{-6} M دگزامتازون تکمیل شده است در دیش های کشت پلاستیکی بذرافشانی می شوند (7×10^{5} سلول زنده در هر میلی لیتر) سلول ها برای چند روز زنده باقی می مانند. با بذرافشانی سلول ها در قالب زیستی (biomatrix) برای چند هفته زنده می مانند. هر چند سلول ها سریعاً عملکردهای متمایز اختصاصی خود را از دست می دهند. با کشت همزمان هپاتوسیت ها با سلول های اپی تلیال کبد رت با فرض این که از سلول های اولیه صفراوی منشأ گرفته اند، می توان پایداری بالاتری(۲ ماه) را بدست آورد. همچنین هپاتوسیت ها، زمانی که بر روی ماتریژل بذرافشانی شوند پایدارتر می باشند و وقتی که در محیط کشت تکمیل شده با EGF و پیروات یا نیکوتین آمید و EGF کشت شوند قادر به طی یک تا سه دور تقسیم سلولی می باشند. ترکیب EGF و DMSO تمایز هپاتوسیت ها را افزایش می دهد.

پانکراس

هم سلول های آکینار(acinar) و هم سلول های جزیره ای (islet) از بافت پانکراس رشد داده شده اند و در رده هایی از immortomouse بوجود آمده اند. تبدیل آدنوما به کارسینوما علاقه خاصی را ایجاد کرده است.

دستور کار۷-۱۵- اپی تلیوم پانکراس

طرح کلی

بافت پانکراس خوکچه هندی را تفکیک کرده، سوسپانسیون مخلوط شده سلولی را توسط الک های نایلون یا ململ (cheesecloth or nylon sieves) صاف کرده و سوسپانسیون را روی یک محلول BSA بریزید. بعد از سه بار مراحل سانتریفوژ و تفکیک متوالی، رسوب سلولی را توزیع کرده و سلول ها را روی ظرف کشت پوشیده شده با کلاژن بذرافشانی کنید.

مواد

استریل:

محیط کشت بافت F12K با ٪۲۰ سرم گوساله (F12K – CS20)

HBSS

HBSS بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} (HBSS-DVC)

دکستروز

آلبومین سرم گاو ، قسمت V

محلول تریپسین: تریپسین ۱:۲۵۰ ، ٪۰/۲۵ در بافرسیترات ، ۳ g/L تری سدیم سیترات، NaCl ۶ g/L ، ۵ g/L دکستروز، ۰/۰۲ g/L فنل رد ، pH ۷/۶

محلول کلاژناز: کلاژناز را در HBSS-DVC ×۱ (pH ۷/۲) حل کرده تا غلظت ۱۸۰۰ U/mL بدست آید.

pH محلول را در ۷/۲ تنظیم کرده و آن را توسط یک غشاء ممانعت (exclusion membrane) ۱۲ KDa به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ °C در برابر HBSS-DVC × ۱حاوی ٪۲۰ گلوکز دیالیز کنید. HBSS دور ریخته می شود و این مرحله برای ۱۸-۱۶ ساعت با HBSS-DVC تازه تکرار می شود. محلول را صاف کرده، استریل نموده و در مقادیر ۲۰-۱۰ mL در دمای ۷۰- °C یا پایین تر ذخیره کنید.

بالن های مخروطی ۲۵ mL

پی پت های ۵ یا ۱۰ mL دهانه گشاد

قیف بوخنر

لوله دیالیز

بالن ۲۵۰ mL دارای لوله جانبی

لوله های سانتریفوژ پلی پروپیلن ۵۰ mL

پارچه ململ
دیش های کشت پوشیده با کلاژن

غیر استریل:

حمام آب شیکر دار
سانتریفوژ

دستورکار

۱-با مخلوط کردن ۱ قسمت کلاژناز با ۲ قسمت محلول تریپسین محلول تفکیک را تهیه و تا دمای $37\ ^\circ C$ گرم کنید.

۲-در شرایط آسپتیک کل پانکراس را خارج کرده (g ۱-۰/۵) و اندام را در F12K-CS20 قرار دهید.

۳-غشاهای مزانتریک و اجسام نامربوط دیگر را زدوده و پانکراس را به قطعات mm ۳-۱ خرد کنید.

۴-قطعات را به یک بالن مخروطی سیلیکونه شده حاوی ۵ mL مایع تفکیک از قبل گرم شده انتقال دهید. محلول را در حدود ۱۲۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $37\ ^\circ C$ در یک حمام آب شیکردار به هم بزنید. این مرحله تفکیک را دو یا سه مرتبه با مایع تازه تکرار کرده تا بیشتر بافت پراکنده شود.

۵-بعد از هر تفکیک اجازه دهید که قطعات بزرگ ته نشین شوند و سوپرناتانت را به یک لوله سانتریفوژ پلی پروپیلن ۵۰mL حاوی حدود ۱۲ mL از F12K-CS20 سرد انتقال داده تا مایع تفکیک خنثی شود.

۶-سوسپانسیون را در ۶۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و مجدداً رسوب را در ۱۰-۵ mL از F12K-CS20 سرد به حالت تعلیق درآورید. سوسپانسیون سلولی را بر روی یخ نگهداری کنید.

۷-سوسپانسیون سلولی را آمیخته و از چندین لایه پارچه ململ استریل در یک قیف بوخنر عبور دهید. با قرا دادن پایه قیف در یک فلاسک خلأ در طی فیلتراسیون، از مکش کم استفاده کنید. یک نمونه را برای سنجش تعداد سلول ها بردارید.

۸-معمولاً در این مرحله $1-2\times10^5$ cells/mg از بافت با ٪۹۰ تا ٪۹۵ زیستایی بدست می آید.

۹-5×10^7 تا 5×10^8 سلول از مایع حاصل شده را در سطح ۴-۲ ستون شامل ۳۵ mL از BSA سرد ٪۴ در HBSS-DVC (pH ۷/۲) در لوله های سانتریفوژ ۵۰mL پروپیلن بریزید.

لوله ها را به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰ rpm سانتریفوژ کنید. این مرحله برای انجام یک جداسازی مناسب سلول های آکینار(acinar) از سلول های جزیره ای (islet) ، مجرایی (ductal) و زمینه ای (stromal) پانکراس حیاتی می باشد. سوپرناتانت را دور ریخته و این مرحله تفکیک را دو بار دیگر تکرار کرده، رسوبات حاصل را مخلوط کرده و بعد از هر مرحله مجدداً در F12K-CS20 به حالت تعلیق در آورید.

رسوبات سلولی را در ۱۰- ۵ mL از F12K-CS20 جمع آوری کنید. یک نمونه را برای شمارش بردارید. بازده $2-5\times10^4$ cells/mg از بافت بدست آمده که ٪۹۵-۸۰ آنها سلول های آکینار می باشند. دانسیته های تلقیح می تواند 3×10^5 /cm^2 باشد. سلول ها چسبیده به طوری که کلنی ها در عرض ۷۲ ساعت تجمع می یابند.

تغییرات

بعد از این که سلول ها چسبیدند، می توان MEM فاقد سرم ، حاوی انسولین (۱۰ng/mL) ، ترانسفرین (۵ ng/mL)، سلنیوم (۹ ng/mL) و EGF (۲۱ ng/mL) را جایگزین F12K-C20 کرد. این محیط کشت رشد سلول های پانکراس را برای حداقل ۱۵ روز بدون تغییر مورفولوژی سلولی حمایت می کند.

روش زیر برای مطالعات در مورد بافت های خوکچه هندی و انسان (بافت اهدایی) به کار می رود. افزودن فیبروبلاست های ریه انسان پرتوتابی شده بعنوان لایه تغذیه کننده، یک تحریک قابل ملاحظه (تا ٪۵۰۰) را در الحاق $[^3H]$ – تیمیدین باعث شده و بقاء را حداقل توسط یک فاکتور از دو فاکتور طولانی تر می کند.

کلیه

کلیه از لحاظ ساختمانی یک اندام پیچیده می باشد که در آن سیستم نفرون ها و لوله های جمع کننده از لحاظ عملکردی و فنوتیپی از تعداد زیادی قطعات مجزا ساخته شده است. بعضی قطعات لوله ای دارای چندین نوع سلول بوده که از لحاظ ریخت شناسی مجزا می باشند. بعلاوه شواهد دلالت بر تغییرات سازگاری سریع در فراساختمان سلولی داشته که ممکن است با تغییرات در عملکرد سلول وابسته باشد. ناهمگنی ساختمانی و سلولی، کار را برای افرادی که کشت سلولی انجام می دهند و علاقمند به جدا کردن جمعیت های سلولی خالص یا کاملاً غنی شده می باشند، مشکل می سازد.

چندین روش برای کشت سلول های قطعات توبولار استفاده شده است. اخیراً روش های شیب چگالی به طور متداول برای جداسازی جمعیت های غنی شده قطعات توبولی که توسط آنزیم هضم شده به کار می رود و مخصوصاً در ایجاد کشت ها سلولی توبول پروکسیمال از حیوانات آزمایشگاهی مؤثر می باشد. همچنین می توان نفرون خاص یا قطعات مجرای جمع کننده را با کالبد شکافی در زیر میکروسکوپ (microdissection) جداسازی کرد و سپس در بستر کشت داد. این روش که با استفاده از حیوانات آزمایشگاهی تکامل

یافت، برای کشت کلیه های انسان و اپی تلیوم دیواره کیست کلیه های پلی سیستیک استفاده می شود. همچنین روش های تشریح ایمنولوژی (immunodissection) و جداسازی ایمنی مغناطیسی(immunomagnetic) برای جداسازی انواع سلول های نفرونی خاص بر اساس بیان آنتی ژنهای خارجی مخصوص سلول به کار می رود. این روش های ظریف نوید بخش مطالعه تیپ های سلولی اختصاصی کلیه در حالت سلامت و بیماری می باشد اما تا به حال تقریباً منحصراً در مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی استفاده شده است.

کشت اولیه قطعات بافت که از کورتکس خارجی کلیه انسان جدا شده است روشی را برای جداسازی سلول هایی ایجاد کرده است که بسیاری از خصوصیات عملکردی توبول پروکسیمال را بیان می کنند. جداسازی آنزیمی تدریجی و فیلتراسیون، باعث تولید سلول های منفرد و توده های کوچکی از سلول ها می شود که وقتی با دانسیته بالا بذرافشانی شوند، منجر به ایجاد یک جمعت غنی شده اپی تلیال ناهمگن می شود. تعداد زیادی از سلول ها را می توان جمع آوری کرد و چندین کشت اولیه دیگر را ایجاد نمود و یا سلول ها را برای ذخیره سازی در حالت منجمد تکثیر کرد.

دستور کار۸-۱۵- اپی تلیوم کلیه

طرح کلی

قطعات بافت کورتکس بیرونی جداشده ، تکه تکه شده، شستشو داده می شود و در یک محلول تریپسین – کلاژناز (با همزنی) انکوبه می شود. در فواصل زمانی معین، بافت با پی پت، نرم شده و سلول های جدا شده جمع آوری و سوسپانسیون سلولی توسط یک غربال با اندازه معین صاف شده تا قطعات هضم نشده جدا شوند. سپس سلول ها را شستشو داده، در محیط کشت تکمیل شده با سرم به حالت تعلیق در آورده و بر روی پلاستیک با گرید کشت، بذرافشانی می شوند.

مواد

استریل:

محیط کشت پایه DMEM/F12 : مخلوط ۵۰:۵۰ از DMEM و Ham's F12

FBS

محیط کشت کامل DMEM/F12 بعلاوه ۱۰٪ FBS

BSS

کلاژناز (Worthington type IV) ۰/۱ ٪، تریپسین (۱:۲۵۰ سیگما) محلول ۰/۱ ٪ در ۰/۱۵ M Nacl

۰/۵ mg/mL DNase در محلول نمکی

محلول تریپسین – EDTA : تریپسین (۱:۲۵۰) ، ۰/۱٪ ، EDTA (گرید کشت، سیگما) ۱ mM

اسکالپل، پنس های مخصوص بافت

غربال Nitex (۱۶۰ µm) (Tetko)

دیش ها و فلاسک های کشت

لوله های ۵۰ mL استریل

غیراستریل:

شیکر اربیتالی

دستور کار

جداسازی بافت:

۱-برش های حلقوی با ضخامت ۱۰-۵ mm را از کلیه تهیه کرده و قطعات را در محیط کشت پایه سرد شده شستشو دهید.

۲-قطعات کورتکس خارجی را جدا کرده و با استفاده از تیغه های متقاطع بافت را به قطعات ۲-۱ mm ببرید.

۳-تقریباً ۵ mL از قطعات بافت را به یک لوله ۵۰ mL حاوی ۲۰ mL محلول تریپسین – کلاژناز گرم انتقال دهید. لوله را بر روی صفحه یک شیکر اربیتالی که در داخل یک انکوباتور ۳۷ °C قرار دارد محکم کنید.

۴-بافت را در حالت همزنی به مدت ۱ ساعت انکوبه کنید.

۵-محلول آنزیمی را خارج کرده و مجدداً محلول آنزیمی جدید جایگزین کنید.

۶-سپس سوپرناتانت را در فواصل زمانی ۲۰ دقیقه بعد از افزودن ۲۰ mL از محیط کشت پایه حاوی ۰/۰۵ mg/mL DNase ، و سایش ملایم توسط یک پی پت ۱۰ mL، جمع آوری کنید (۱۰ چرخه).

۷-سوپرناتانت جمع آوری شده را با یک حجم مساوی از محیط کشت کامل رقیق کرده و سوسپانسیون بدست آمده را بر روی یخ نگهداری کنید.

۸-این فرایند جمع آوری سلولی را ۵ بار یا بیشتر تکرار کرده تا قطعات به طور کامل پراکنده شوند.

۹-سوپرناتانت های جمع آوری شده را مخلوط کرده و آنها را در لوله های ۵۰mL توزیع کنید.

۱۰- کشت را با سانتریفوژ کردن [۱۲۰۰ rpm (۱۰۰ g) به مدت ۱۵ دقیقه] رسوب داده و هر رسوب را با ۴۵ mL از محیط کشت کامل حاوی DNase مجدداً به حالت تعلیق در آورید.

۱۱- سوسپانسیون را با استفاده از پارچه Nitex (۱۶۰ µm) صاف کنید.

۱۲- دستور کار جداسازی، علاوه بر سلول های منفرد، توده های سلولی را هم تولید می کند. بنابراین شمارش کردن سلول ها غیر قابل اعتماد می باشد. برای تکثیر سلول ها به منظور واکشت یا منجمد نگهداری برای یک فلاسک ۷۵ -cm^2 از ۱۵ mL استفاده کنید.

واکشت و منجمد نگهداری: سلول های NHK-C را با روش های معمول واکشت دهید. جداسازی توسط تریپسین–

EDTA یک سوسپانسیون یکنواخت تولید کرده تا برای شمارش توسط هموسیتومتر مناسب می باشد. دیش های گرید کشت را با حدود $۱۰^۵$ ×۱ سلول در هر سانتیمتر مربع بذرافشانی کنید. منجمد نگهداری با استفاده از محیط کشت کامل حاوی ٪۱۰ DMSO توسط روش های معمول صورت می پذیرد.

اپی تلیوم برونش و تراشه

در حضور سرم، سلول های اپی تلیال برونشی نرمال انسان (Normal Human Bronchial Epithelial cells: NHBE) از تقسیم باز ایستاده و در نهایت تمایز می یابند. محیط کشت فاقد سرم که برای رشد سلول NHBE بهینه سازی شده است از همانندسازی سلولی فیبروبلاست ریه حمایت نکرده، بنابراین امکان تولید کشت های سلولی NHBE خالص را فراهم می سازد.

دستور کار۹-۱۵- اپی تلیوم برونش و تراشه

طرح کلی

این روش شامل کشت قطعاتی از بافت مجرای هوایی بزرگ در یک محیط کشت فاقد سرم (LHC-9) به منظور شروع و سپس تکثیر سلول های NHBE بدون فیبروبلاست می باشد. چهار واکشت و ۳۰ دو برابر شدن جمعیت معمول است.

مواد

استریل:

محیط کشت:

L-15(a

LHC-9(b

HB(c

بافت برونش از اتوپسی دهنده های غیر سرطانی

دیش های کشت بافت پلاستیکی (۶ و ۱۰ سانتیمتری)

FN/V/BSA : مخلوط فیبرونکتین انسانی μg/mL ۱۰، کلاژن ۳۰μg/mL (Vitrogen 100) ، و آلبومین سرم گاوی کریستاله شده μg/mL (BSA) ۱۰ در محیط کشت پایه LHC

تریپسین ٪۰/۰۲ ، ۰/۵ mM EGTA و محلول ٪۱ پلی وینیل پیرولیدین

اسکالپل شماره ۱۶۲۱(BD Biosciences)

قیچی جراحی

پنس های تشریح میکروسکوپی نیمه خمیده

مخلوط گازی با O_2 بالا (O_2 ٪۵۰ ، N_2 ٪۴۵ و CO_2 ٪۵)

غیر استریل:

دستکش (بافت انسان ممکن است با عوامل مخاطره آمیز بیولوژیکی آلوده شود)

محفظه با اتمسفر کنترل شده (Bellco No. 7741)

Rocker platform

دستور کار

۱-یک دیش کشت را با ۱mL از مخلوط FN/V/BSA به ازای هر دیش ۶ cm پوشانده و دیش را در انکوباتور CO_2 مرطوب در دمای ۳۷ °C برای حداقل ۲ ساعت (نباید از ۴۸ ساعت تجاوز کند) انکوبه کنید. با مکش خلأ مخلوط را خارج کرده و دیش را با ۵ mL از محیط کشت پر کنید.

۲-بافت ریه را که در شرایط آسپتیک از دهنده های غیر سرطانی تشریح و در عرض ۱۲ ساعت گذشته بافت برداری شده است، برای انتقال به آزمایشگاه در محیط کشت L-15 سرد شده در یخ گذاشته تا در آزمایشگاه، برونش از بافت اطراف آن جداسازی شود.

۳-قبل از کشت دادن، یک ناحیه یک سانتیمتر مربعی را با یک تیغ اسکالپل در یک طرف سطح دیشهای کشت ۶ cm خراش دهید.

۴-مجاری هوایی(غوطه ور در محیط کشت L-15) را با قیچی جراحی باز کرده و بافت را با یک اسکالپل به دو قطعه ۳ × ۲ cm ببرید(قاچ کنید، اره نکنید).

۵-با استفاده از یک حرکت ملاقه ای برای ممانعت از آسیب رسیدن به اپی تلیوم، تکه های مرطوب را برداشته و آنها را به صورتی که سطح اپی تلیوم به طرف بالا باشد بر روی ناحیه خراشیده شده دیش ۶ cm قرار دهید. محیط کشت را خارج کرده و قطعات را به مدت ۵-۳ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه کرده تا زمان لازم برای اتصال آنها به سطوح خراشیده دیش ها فراهم شود.

۶- ۳mL محیط کشت HB به هر کدام از دیش ها افزوده و آنها را در یک محفظه با اتمسفر کنترل شده بر روی یک rocker platform قرار دهید.

۷-محفظه را با یک مخلوط گازی حاوی اکسیژن زیاد پر کنید.

۸-محفظه را به میزان ۱۰ دور در دقیقه به حرکت در آورده تا موجب شود که محیط کشت به طور متناوب روی سطح اپی تلیال جریان یابد.

۹-قطعات بافت در حال جنبش را در دمای ۳۷ °C انکوبه کرده، محیط کشت و اتمسفر را بعد از ۱ روز و ۲روز فاصله زمانی به مدت ۸-۶ روز تعویض کنید. این مرحله هر گونه آسیب کم خونی موضعی اپی تلیوم که از زمان مرگ فرد دهنده تا زمان گذاشتن بافت در محیط کشت L-15 سرد شده در یخ اتفاق می افتد را برگرداننده، کشت های بعدی را بهبود می بخشد.

۱۰- قبل از کشت دادن، هفت ناحیه از سطح هر دیش کشت ۱۰ cm را با یک اسکالپل خراش دهید. سطوح دیش های کشت خراشیده شده را با محلول مخلوط FN/V/BSA بپوشانید و مطابق قبل محلول اضافی را خارج کنید.
۱۱- قطعات مرطوب را به تکه های ۷×۷ mm بریده و تکه ها را به صورتی که اپی تلیوم به سمت بالا باشد بر روی نواحی خراشیده شده کشت دهید.
۱۲- قطعات را مطابق قبل بدون محیط کشت به مدت ۵-۳ دقیقه در درجه حرارت اتاق انکوبه کنید.
۱۳- ۱۰ mL محیط کشت LHC-9 به هر دیش افزوده و کشت ها را در دمای ۳۷ °C در یک انکوباتور دارای ۵٪ CO_2 مرطوب انکوبه کنید
۱۴- هر ۴-۳ روز محیط کشت مصرف شده را جایگزین کنید.
۱۵- بعد از ۱۱-۸ روز انکوباسیون، زمانی که سلولهای اپی تلیال بدست آمده از کشت بافت بیش از ۰/۵ cm گسترش یافتند، کشت ها را به دیش های کشت جدید که خراش داده شده و برای تولید محصول جدید از سلول های اپی تلیال با FN/V/BSA پوشیده شده، انتقال دهید.
این مرحله را می توان تا هفت مرتبه با بازده بالایی از سلول های NHBE تکرار کرد.
۱۶- کشت های postexplant Outgrowths را در محیط کشت LHC-9 به مدت ۴-۲ روز دیگر قبل از تریپسینه کردن (با محلول تریپسین/PVP/EGTA) برای واکشت یا برای مصرف آزمایشگاهی انکوبه کنید.

پروستات

دستور کار ۱۰-۱۵- اپی تلیوم پروستات

طرح کلی

پروستات ها را خارج کرده و برای کشت سلولی آماده کنید(۳۰ دقیقه). بافت پروستات را با کلاژناز انکوبه کرده (۱ ساعت) و سلول های منفرد و توده های کوچک سلولی را جمع آوری کنید(۱ ساعت). سلول ها را تلقیح کرده و کشت داده تا تک لایه متراکم تشکیل شود (۷ روز).

مواد

استریل:

محیط کشت WAJC404
محلول نمکی (MSS) Media
a) ۱۲ mM Nacl
b) ۲ mM KCL
c) ۱mM KH_2PO_4
d) HEPES با pH ۷/۶ ، ۳۰ mM
e) گلوکز ۴ mM
f) فنل رد ۳/۳ μM
سرم جنین گاو یا اسب
پنی سیلین
سم کلرا
دگزامتازون
فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)
پرولاکتین گوسفند یا رت
انسولین
پروستاتروپین (فاکتور رشد سلول های اپی تلیال پروستات) خالص یا نسبتاً خالص
کلاژناز تیپ I
پتری دیش های (پلاستیکی یا شیشه ای) ۶ cm
قیچی
سرنگ و کانولا 14-G
فلاسک های ارلن مایر ۲۵ mL
غربال سیمی دارای منافذ ۱ میلیمتری که در یک لوله سانتریفوژ مخروطی ۵۰mL قرار گرفته است.
لوله سانتریفوژ مخروطی پلاستیکی ۵۰ mL
فیلترهای نایلون ۲۵۰ و ۱۵۰و ۱۰۰ و ۴۰ μm تا در لوله های مخروطی ۵۰ mL قرار گیرند.
دیش های کشت بافت پلاستیکی ۲۵ خانه

غیر استریل:

سانتریفوژ
حمام آب شیکردار ۳۷ °C
هموسیتومتر یا دستگاه شمارشگر سلولی
رت های نر با سن ۱۲-۱۰ هفته

دستور کار:

۱- قسمت های مورد نظر پروستات را در شرایط آسپتیک برداشته و آنها را در یک پتری دیش استریل ۶ cm قرار دهید.
۲- چربی قطعات را جدا کرده و سپس آنها را وزن کنید.
۳- ۲ mL کلاژناز با غلظت ۶۷۵ U/mL در MSS حاوی ۱۰۰ U/mL پنی سیلین و ۱۰۰ μg/mL کانامایسین اضافه کنید.
۴- بافت را با قیچی به قطعات حدود ۱ mm برش دهید تا بتوان آنها را در یک کانولا 14-G قرار داد.
۵- قطعات ریز شده بافت را توسط یک سرنگ و کانولا 14-G به یک فلاسک ارلن مایر ۲۵mL انتقال دهید. به ازای هر ۰/۱ گرم وزن بافت تر اصلی، ۱mL کلاژناز اضافه کنید.
۶- به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ °C در حمام آب شیکردار انکوبه کنید.

۷-سوسپانسیون هضم شده را سه بار توسط یک کانولا 14-G خارج کرده و سپس سوسپانسیون را از یک غربال سیمی درشت(۱ mm) که در لوله های مخروطی پلاستیکی ۵۰mL قرار گرفته است عبور داده تا ضایعات سلولی و مواد هضم نشده برطرف شوند. سوسپانسیون را با یک حجم مساوی از MSS حاوی٪ ۵ FCS کامل یا سرم اسب شستشو دهید.

۸-با سانتریفوژ در ۱۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ °C سلول ها را جمع آوری کنید.

۹-دوباره رسوب سلولی را در ۵ mL از MSS دارای ٪ ۵ سرم به حالت تعلیق در آورده و به طور متوالی سوسپانسیون را از فیلترهای نایلونی دارای منافذ ۲۵۰ ، ۱۵۰ ، ۱۰۰، و ۴۰ µm عبور دهید. هر غربال را با ۵ mL از MSS دارای ٪ ۵ سرم شستشو دهید.

۱۰-سلول ها را با سانتریفوژ کردن جمع آوری نموده و مجدداً آنها را در ۵ mL محیط کشت مغذی WAJC404 به حالت تعلیق در آورید.

۱۱-سلول ها را شمارش کرده و غلظت آنها را تا 4×10^6 سلول در هر میلی لیتر تنظیم کنید.

۱۲- ۵۰ µL از سوسپانسیون سلولی حاوی 2×10^5 سلول را در هر یک از چاهک های یک پلیت ۲۴ خانه (سطح هر چاهک $\sim 2\ cm^2$) حاوی ۱ mL محیط کشت WAJC404 ، ۱۰ ng/mL سم کلرا، ۱ µM دگزامتازون ، ۱۰ ng/mL ازEGF ، ۱ µg/mL پرولاکتین، ۵ µg/mL انسولین ، ۱۰ ng/mL پروستاتروپین، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین تلقیح کنید.

۱۳-کشت را در یک اتمسفر مرطوب دارای ٪ ۹۵ هوا و ٪ ۵ CO_2 در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید. محیط کشت را در روزهای ۳و ۵ تعوض کنید. سلول ها باید تا روز هفتم نزدیک حالت تراکم باشند.

سلول های مزانشیمی(Mesenchymal cells)

این گروه شامل سلول هایی می باشد که از مزودرم جنینی منشاء گرفته اند اما شامل سیستم خونساز (hematopoietic system) نمی شود. سلول های مزانشیمی شامل سلول های ساختمانی (بافت همبند، عضلانی و استخوان) و عروقی(اندوتلیوم عروق خونی و عضله صاف) می باشد. در حالیکه سلول های اپی تلیال بعنوان پارانشیم (parenchyma) طبقه بندی می شوند، سلول های عملکردی اصلی در داخل یک اندام و سلول های بافت همبند بعنوان استروما(stroma) یا بافت پشتیبان طبقه بندی می شوند.

بافت همبند

معمولاً سلول های بافت همبند به عنوان علف های هرز کشت بافت تلقی می شوند. آنها در اغلب تکنیک های ایجاد اکسپلنت مکانیکی و آنزیمی زنده مانده و می توانند در محیط های کشت بسیار ساده بخصوص اگر سرم موجود باشد کشت داده شوند. هر چند سلول هایی که معمولاً به نام فیبروبلاست نامیده می شوند از بسیاری از بافت ها مختلف جداسازی شده اند و فرض می شود که سلول های بافت همبندی می باشند، هویت دقیق سلول ها در این دسته تا اندازه ای مبهم باقی مانده است. رده های فیبروبلاست (مثل 3T3 موش) کلاژن نوع I و III را تولید کرده و آن را در محیط کشت آزاد می کنند. در حالی که تولید کلاژن محدود به فیبروبلاست ها نمی باشد، ساخت نوع I در مقادیر نسبتاً زیاد جزء ویژگی های بافت همبند می باشد. هر چند می توان سلول های 3T3 را برای تمایز به سلول های چربی و سلولهای ۱۰T½ را در پاسخ به پروتئین های مورفوژنتیک استخوان (bone morphogenetic proteins: BMP) به غضروف و استخوان القاء کرد. بنظر می رسد رده های سلولی فیبروبلاست جنین موش از قبیل 3T3 و ۱۰T½ اولین سلول های مزودرمی می باشند که ممکن است برای تمایز در بیش از یک جهت القاء شوند.

فیبروبلاست های انسان، هامستر و جوجه از لحاظ ریخت شناسی از فیبروبلاست های موش متمایز می باشند، چون آنها در مرحله تراکم یک شکل دوکی شکل داشته و فیبروبلاست های موش به صورت ظاهر سنگفرشی دیده می شود. سلول دوکی شکل ممکن است سلول پیش ساز بیشتر متعهد شده بوده و ممکن است صحیح تر باشد که یک فیبروبلاست نامیده شود. ممکن است اگر اجازه داده شود سلول ها NIH3T3 که در دانسیته سلولی باقی بمانند دوکی شکل شوند. پیشنهاد شده است که ممکن است رده های سلولی فیبروبلاست از پری سیت های عروقی (vascular pericytes) ، سلول های شبیه بافت همبند در عروق خونی منشأ گرفته باشند اما تأیید آن بدون وجود مارکرهای مناسب مشکل می باشد.

بدیهی است که رده های سلولی که معمولاً فیبروبلاست نامیده می شوند را می توان از بافت های جنینی و بالغ کشت داد اما نباید این رده ها را بدون تایید توسط مارکرهای مناسب بعنوان سلول های فیبروبلاست یا مشابه آنها قلمداد کرد. کلاژن نوع I یکی از این مارکرها می باشد. همچنن آنتی ژن Thy I هم استفاده می شود، هر چند ممکن است بر روی تعدادی از سلول ها خون ساز هم وجود داشته باشد.

کشت های فیبروبلاست های جنینی یا بالغ را می توان با اکسپلنت اولیه، تریپسینه کردن گرم و سرد و هضم با کلاژناز آماده کرد.

بافت چربی

در حالی که ممکن است تهیه کشت از سلول های چربی بالغ مشکل باشد، ممکن است در کشت های سلول های مزانشیمی (مثل 3T3-L1 موشی) با نگهداری سلول ها در دانسیته بالا به مدت چند روز ، تمایز القاء شود. به نظر می رسد یک فاکتور چربی زا (adipogenic factor) در سرم مسئول القاء باشد. همچنین می توان کشت های اولیه سلول های چربی را از اپیدیدیم (epididymus) رت توسط هضم با کلاژناز تهیه کرد.

سلول های چربی (adipocytes) سلول های تخصص یافته ای بوده که اولین نقش فیزیولوژیک آنها به عنوان یک مخزن انرژی برای بدن توصیف شده است. سلول های چربی زمانی که انرژی مازاد بر نیاز می باشد بعنوان یک مخزن ذخیره سازی تری گلیسریدها بوده و در زمان نیاز به انرژی، یک منبع انرژی به شکل اسیدهای چرب آزاد بوده که توسط لیپولیز آزاد می شوند. اخیراً، نقش مهم سلول های چربی به عنوان تنظیم کننده مثبت متابولیسم کربوهیدرات ها و لیپیدها توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. احتمال دارد که اختلالات خاص در بافت چربی بتواند مستقیماً در بیماریزایی بیماری های متداول مثل دیابت ها، افزایش فشار خون و چاقی دخالت داشته باشد.

دستور کار۱۱-۱۵- کشت اولیه سلول های چربی

مواد

استریل:

DMEM-A : DMEM با pH ۷/۴ ، حاوی ۲۵ mM گلوکز ، ۲ mM گلوتامین، ۲۰۰ nM از N^6-(R) (۱-متیل-۲-فنیل اتیل) آدنوزین، ۱۰۰ µg/mL جنتامایسین و ۲۵ mM HEPES که در مقادیر ۱۰۰ mL تهیه شده و قبل از استفاده تا دمای ۳۷ °C گرم می شود.

DMEM-B : DMEM-A به اضافه ۷٪ BSA

بافر KRBH : محیط کشت Krebs-Ringer با pH ۷/۴ ، حاوی ۱۰ mM $NaHCO_3$ ، ۳۰ mM HEPES ، ۲۰۰ nM آدنوزین و ۱٪ (W/V) BSA.

برای تهیه ۱ لیتر بافر KRBH ، ۷ g NaCl ، ۰/۵۵ g KH_2PO_4 ، ۰/۲۵ g $.7H_2O$ $MgSO_4$ ، ۰/۸۴ g $NaHCO_3$ ، ۰/۱۱ g $CaCl_2$ ، ۷/۱۵g HEPES ، ۱۰g BSA ، ۱ mL آدنوزین ۲۰۰ µM و UPW تا حجم یک لیتر را اضافه کنید. در مقادیر ۱۰۰ mL توزیع کنید. قبل از استفاده تا دمای ۳۷ °C گرم کرده و pH را در ۷/۴ تنظیم کنید.

بافر KRBH-A : KRBH با ۵ ٪ BSA

کلاژناز ۲۰ mg/mL در ۲ mL بافر KRBH و با عبور از فیلتر ۰/۲۲ µm استریل شود

پتری دیش های کشت بافت به قطر ۶ cm

لوله سانتریفوژ مخروطی ۵۰ mL

لوله های پلی پروپیلن۱۰۰mm × ۱۷ mm

لوله های پلی پروپیلن ۳۰ mL با دانسیته کم

فیلتر مشبک نایلونی ۲۵۰ µm در نگهدارنده یا قیف فیلتر

سر سمپلرهای دهان گشاد ۲۰۰ µL

قیچی: دو قیچی تشریح تند ۱۰cm (۴ in) ؛ پنس های Perry ۱۲/۵ cm (۵ in)

غیر استریل :

رت های Sprague-Dawley نر (۱۴۵-۱۷۰ g ، نژاد CD)

جعبه لاستیکی که با یک مخلوط گازی شامل ۷۰ ٪ CO_2 و ۳۰ ٪ O_2 تزریق شده است

گیوتین (ماشین گردن زنی)

سمپلر برای سر سمپلرهای ۲۰۰ µL

دستور کار

کالبد شکافی صفحه چربی مربوط به مجرای خروجی بیضه ها: (Dissection of Epididymal Fat pads)

۱-رت ها را در یک جعبه پلاستیکی حاوی مخلوط گازی ۷۰ ٪ CO_2 و ۳۰٪ O_2 بیهوش کنید.

۲-با استفاده از یک گیوتین رت ها را سر بریده و خون آنها را بکشید.

۳-تنه ها را به طور مختصر در اتانول ۷۰٪ قرار دهید.

۴-در بالاترین سطح ممکن استریلیتی لایه چربی مربوط به مجرا خروجی بیضه ها را بردارید.

a) برای دسترسی به صفاق، قسمت پایینی پوست شکم را با قیچی برش دهید.

b) توسط یک قیچی دیگر، صفاق را باز کرده و بیضه ها را با یک پنس نگه دارید.

c) لایه چربی را از مجرای خروجی بیضه ها تراشیده و مراقب باشید که عروق خونی در پشت باقی بمانند.

۵-بافت را به آزمایشگاه کشت انتقال دهید.

هضم با کلاژناز و شستشوی سلول های چربی:

۶-۴ گرم از چربی (تقریباً معادل ۸ لایه چربی) را در یک ویال پلی پروپیلن ۳۰ میلی لیتری با دانسیته کم که حاوی ۴ mL بافر KRBH در دمای۳۷ °C می باشد، وارد کنید.

۷-با استفاده از قیچی، این چربی ها را به قطعات با قطرحدود ۲ mm خرد کنید.

۸-۱ mL محلول کلاژناز به ویال حاوی چربیهای خرد شده اضافه کنید و آنها را در یک حمام آب شیکر دار در دمای

۳۷ °C تقریباً به مدت یک ساعت انکوبه کرده تا مخلوط سلولی یک حالت خامه ای به خود بگیرد.

۹-بعد از هضم با کلاژناز ، ۱۰ mL بافر KRBH در دمای ۳۷ °C به ویال اضافه کنید.

۱۰- سلول های درون ویال را با چرخاندن مخلوط کنید و سلول ها را به آرامی از یک فیلتر مشبک نایلونی ۲۵۰ µm عبور داده و وارد یک لوله مخروطی ۵۰ میلی لیتری کنید.

۱۱- با افزودن ۳۰ mL بافر KRBH در دمای ۳۷ °C به لوله و سانتریفوژ مختصر در ۲۰۰ g با یک سانتریفوژ رومیزی، سلولها را شستشو دهید. با یک پی پت، مایع فاز زیرین (infranatant) را خارج کنید. دقت کنید که سلول های چربی بالای بافر آبی شناور می باشند.

۱۲- شستشوی سلول ها را با افزودن ۴۰ mL بافر KRBH ، سانتریفوژ کردن و خارج کردن مایع فاز زیرین دو بار دیگر تکرار کنید.

۱۳- سلول ها را دو بار با ۴۰ mL از DMEM-A در دمای ۳۷ °C شستشو دهید.

۱۴- بعد از شستشوی نهایی، سلول های سطح محیط کشت را مجدداً در DMEM-A در یک سیتوکریت (cytocrit) حدود ٪۴۰ به حالت تعلیق در آورید.

کشت اولیه سلول های چربی:

۱۵-۲ mL از سوسپانسیون DMEM-A در سیتوکریت ٪۴۰ را با استفاده از سر سمپلرهای دهان گشاد ۲۰۰ µL به یک دیش کشت بافت ۶ cm انتقال دهید.

۱۶- سلول ها را به مدت۱/۵ ساعت در یک انکوباتور مرطوب در دمای ۳۷ °C دارای ٪۵ CO_2 قرار دهید.

۱۷- ۵ mL از DMEM-A به هر دیش اضافه کنید.

در این مرحله آزمون جذب گلوکز را بر روی یک نمونه از سلول ها انجام داده تا میزان زیستایی آنها بررسی شود.

عضله

عضله صاف: سلول های عضله صاف از بافت عروقی رشد داده شده و با اندوتلیوم عروقی به طور همزمان کشت داده شده اند.

دستور کار۱۲-۱۵- جداسازی سلول های عضله صاف

مواد

استریل:

محیط کشت سلول عضله صاف (SMCM) :DMEM تکمیل شده با ٪۲۰ سرم جنین گاو، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین و ۱۰۰µg/mL استرپتومایسین

٪ ۰/۲۵ تریپسین / EDTA

پتری دیش های ۲/۵ cm × ۱۵ و ۱/۵ cm×۶

اسکالپل و تیغه جراحی شماره ۱۰

قیچی تشریح

پنس بافت

دستور کار

۱-آئورت توراسیک را از گوساله های جوان بدست آورید.

۲-آئورت را در محلول سالین Hank غوطه ور سازید.

۳-تا زمان جداسازی سلول ها آن را بر روی یخ نگهداری کنید.

۴-آئورت را برای تشریح در داخل یک پتری دیش ۱۵×۲/۵ cm قرار دهید.

۵-آئورت را به صورت طولی با قیچی تشریح برش دهید.

۶-به آرامی سطح لومینال آئورت را با تیغه اسکالپل تراشیده تا سلول های اندوتلیال برطرف شوند.

۷-لایه میان آئورت را از لایه های adventitial و intimal جدا کنید.

۸-لایه میانی را به قطعات حدود ۱ cm^2 برش دهید.

۹-قطعات را به صورتی که جهت intimal به سمت پایین باشد در پتری دیش های ۱/۵ cm×۶ قرار دهید.

۱۰- اجازه دهید که قطعات به مدت ۱۰ دقیقه به دیش ها متصل شوند.

۱۱-۱ mL از SMCM را مستقیماً به قطعه میانی در هر دیش اضافه کنید.

۱۲- قطعات میانی را در انکوباتور مرطوب در دمای ۳۷ °C و ٪۱۰ CO_2 به مدت یک شب قرار دهید.

۱۳- روز بعد، ۵ mL از SMCM تازه به هر دیش اضافه کنید و مراقب باشید قطعات از دیش جدا نشوند.

۱۴- قطعات میانی را به مدت ۱۰ روز دیگر در یک انکوباتور نگهداشته تا بعد از این مدت سلول های عضله صاف (SCMs) از قطعات مهاجرت کرده و در کشت دو بعدی پابرجا شوند.

۱۵- سلول ها را زیر حالت تراکم با استفاده از تریپسین/EDTA ٪۰/۲۵ پاساژ دهید.

دستور کار۱۳-۱۵- کشت میوبلاست عضله اسکلتی افراد بالغ

طرح کلی

کشت هـای اولیـه را میتـوان بـه آسـانی در محیـط کـشت Ham's F12 که با ٪۲۰ سرم جنین گاو (FBS) تکمیل شده است رشد داد. این سلول ها بدون تغییـر دادن شـرایط کـشت، تکثیـر شـده و بـا آمیختـن بـه شـکل لولـه هـای عـضلانی چند هسته ای تمـایز مـی یابنـد کـه تأییـد کنـده میوژنیـسیته (myogenicity) سلول های کشت یافته می باشد.

مواد

استریل:

محیط کـشت انتقـال: Ham's F12 بـدون $NaHCO_3$ و دارای ۲۰mM HEPES، ۷۵ mL

محیط کشت رشد: Ham's F12 با ٪۲۰ سرم جنین گـاو ، ۲۰ mL

محلـــول پرونــــاز: پرونــــاز ٪۰/۱۵ و EDTA ٪۰/۰۳ بــا ۲۰ IU/mL پنی سیلین و ۲۰ µg/mL استرپتومایـسن (٪۰/۴) در Ham's F12 یا D-PBS ، ۱۰۰ mL

D-PBSA , ۱۰۰ mL

غربال نایلونی ۱۰۰µm

اسکالپل

قیچی بلند و ظریف

پتری دیش تشریح ۹ سانتیمتری

فلاسک ۲۵ cm^2، ۴ عدد

لوله های سانتریفوژ ۲۰ mL یا ظروف یونیورسال، ۵ عدد

غیر استریل:

هموسیتومتر

دستور کار

تفکیک:

۱-بافت غیر عضلانی را با یک اسکالپل از بیوپسی جدا کـرده و در D-PBSA شستشو دهید.

۲-بیوپسی را به قطعات موازی بـا فیبرهـا بـرش داده و قبـل از وزن کردن بیوپسی در D-PBSA شستشو دهید.

۳-تکه ها را به صورت مـوازی بـا یکـدیگر در سـرپوش یـک پتری دیش قرار داده و قطعات را بدون این که بافت له شود به اسـتوانه هـای بـاریکتر و سـپس در نهایـت بـه قطعـات ۱ mm^3 برش دهید. برش نهایی را می توان در یک لوله با یک قیچی بلند انجام داد تا از له شدن بافت جلوگیری شود.

۴-تکه هـا را بـا D-PBSA شستـشو داده و اجـازه دهیـد کـه ته نشین شوند. سوپرناتانت را دور بریزید.

۵-قطعات را به مـدت ۱ سـاعت در دمـای ۳۷ °C در محلـول پروناز هضم کنید(برای یـک بیوپـسی ۳-۱ mg از ۱۵ mL استفاده کنید). لوله را در فواصل زمانی ۱۵-۱۰ دقیقه شـیک کنید.

۶-بعد از انکوباسیون، توسط یک پی پت کشت را بـسائید. هـر چقدر سلولها بیشتر آزاد شـوند بایـد محـیط کـشت کـدرتر شود.

۷-اجازه دهید قطعات در ته لوله ته نشین شده و رسوب P1 و سوپرناتانت S1 تشکیل شود.

۸-S1 را توسط یـک غربـال نـایلونی ۱۰۰ µm در یـک لولـه سانتریفوژ ۲۰ mL فیلتـر کنیـد. سـوپرناتانت را بـه آرامـی شیک یا پی پت کرده تا سلول ها مجـدداً بـه حالـت تعلیـق در آیند.

۹-لولـه را در ۳۵۰ g بـه مـدت ۱۰-۸ دقیقـه سـانتریفوژ کنیـد. سوپرناتانت را دور بریزید.

۱۰-سوسپانسیون را توسط یـک پـی پـت rubber-bulb در دقیقاً ۱۰ mL محیط کشت، با ملایمت بسیار زیاد به حالت تعلیق مجدد در آورید و سـلول هـا را توسـط هموسـیتومتر شمارش کنید.

۱۱- سوسپانـسیون را در محـیط کـشت رشـد رقیـق کـرده تـا فلاسک های کشت را با حدود $۱/۵×۱۰^۴$ سلول/ میلـی لیتـر بذرافشانی کنید. در حدود $۱-۲×۱۰^۵$ سلول / گرم از بیوپسی نمونه های سالم بدست می آید.

۱۲-۱۵ mL محیط کشت هضم به P1 افزوده و تکه هـا را بـه مدت ۳۰ دقیقـه در حمـام آب در دمـای ۳۷ °C بـا شـیک کردن متناوب انکوبه کنید.

۱۳-برای جداسازی سلول ها، سوسپانسیون را پی پـت کـرده و سپس سوسپانسیون را توسط غربال نایلونی فیلتر کنید. فیلتر را با ۲۰ mL محیط کشت رشد شستشو دهید.

۱۴- سوسپانسیون را به مدت ۱۰-۸ دقیقه در ۳۵۰ g سانتریفوژ کرده، سلول ها را شمرده و مطابق قبل بذرافشانی کنید.

۱۵- فلاسک ها را به یـک انکوبـاتور ۳۷ °C دارای ٪۵ CO_2 انتقال دهید.

نکته ایمنی) باقیمانده بیوپسی و تمـام لولـه هـا، پـی پـت هـا، پلیت ها و غیره که در این روش استفاده شده است را باید قبل از دور ریختن با هیپوکلریت تیمار کرد.

نگهداری کشت ها:

۱۶-محیط کشت را ۲۴ ساعت پس از بذرافـشانی و سـپس هـر ۴-۳ روز یک بار بسیار آرام عوض کنید.

پیشرفت این کشت ها بیشتر به سمت تمـایز مـی باشـد. زمان سه فاز سلولهای عضلانی انسان بـرای تکثیـر، حـداکثر ۶-۴ روز می باشد؛ بنابراین سـلول هـا در حـدود روز ۸ در یک ردیـف قـرار گرفتـه و تقریبـاً در روزهـای ۱۲-۱۰ یـک افزایش در آمیختگی سـلولی و تـشکیل لولـه هـای عـضلانی مشاهده می شود. با وجود ایـن، بایـد بـه خـاطر داشـت کـه بعضی از سلول ها ممکن است زودتر تمایز یابند و زمانی که اکثر کشت تمایز را طی کرده است بقیه سـلول هـا هنـوز در حال تکثیر خواهند بود.

واکشت:

۱-حجم کمی از EDTA را به آرامی به سلول ها اضافه کرده و بلافاصله آن را خارج کنید.

۲-مقدار کافی از محلول تریپسین (٪ ۰/۲۵) اضافه کرده تا یک لایه نازک روی سلول ها تشکیل شود.

۳-وقتی سلول ها جدا شدند ، ۵ تا ۱۰ میلی لیتر محیط کشت رشد کامل به آنها اضافه کرده، کشت را بسیار آرام به داخل و خارج پی پت کشیده و سپس سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در g ۳۵۰ سانتریفوژ کنید.

۴-مقدار سلول ها را شمارش کرده و سلول ها را با غلظت انتخابی بذرافشانی کنید.

شاخص های تکثیر و تمایز: منحنی های رشد کشت های سلولهای عضلانی انسانی بدست آمده در محیط کشت Ham's F12 که با ٪۲۰ FBS تکمیل شده است، سه فاز معمول را نشان می دهد: فاز تاخیر، فاز نمایی و فاز سکون که مطابق با شروع آمیختگی می باشد. آخرین ارزیابی انجام شده از لحاظ تعداد هسته های ترکیب شده در لوله های عضلانی یا از لحاظ شاخص ترکیب (درصد هسته های ترکیب شده در لوله های عضلانی نسبت به تعداد کل هسته ها) نشان دهنده این است که معمولاً در روز ۸ بعد از کشت، شروع شده و در حدود روز ۱۰ به طور برجسته ای افزایش می یابد. بسته به نمونه این زمان ممکن است با یک روز اختلاف تغییر کند. بنابراین، تمایز که به صورت تعداد هسته ها در هر سانتی متر مربع هر لوله عضلانی بیان می شود، ممکن است از لحاظ ریخت شناسی مشاهده شود. اما فرایند تمایز را می توان با استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی (از قبیل پروتئین های سارکومری) آنزیم های دخیل در تمایز (مثل کراتین فسفوکیناز) یا پیدایش α- اکتین نیز بررسی کرد.

نشان داده شده است که یک خانواده از ژن ها که شناخته شده ترین آنها MyoD می باشد، بیان ژن مخصوص عضله ای را در پیش سازهای میوژنیک فعال می کند. تمایز سلولی میوژنیک شامل فعال سازی انواع ژنهای دیگر با تغییرات هماهنگ در خصوصیات چسبندگی سطح سلولی بوده و یا اخیراً نشان داده شده است نیازمند فعال کننده پلاسمینوژن سطح سلولی، یورکیناز و گیرنده آن می باشد.

تغییرات و کاربردها: وقتی هدف مطالعه مکانیسم تمایز باشد، امکان انتخاب بین روش های اکسپلنت و آنزیمی وجود دارد. اگر هدف بدست آوردن میزان زیادی از سلولها برای مطالعات بیوشیمیایی یا مولکولی باشد، روش آنزیمی ترجیح داده می شود.

دستورکار زیر برای کشت رشته عضلانی منفرد، وقتی که استخراج همه سلول های اقماری(satellite cells) لازم بوده یا اجتناب از آلودگی با سلول های غیر عضلانی مهم باشد، با ارزش می باشد.

دستور کار۱۴-۱۵- کشت رشته عضلانی منفرد از عضله اسکلتی

طرح کلی

رشته های عضلانی منفرد با سایش عضله اسکلتی تیمار شده با کلاژناز، آزاد شده و بعد از کشت بر روی ماتریژل، توده رشد یافته جمع آوری می شود.

مواد

استریل:

ماتریژل(Matrigel TM) ۱ mg/mL در DMEM

محیط کشت DMEM

L- گلوتامین ۲۰۰ mM

محلول پنی سیلین - استرپتومایسین: پنی سیلین ۱۰ U/mL[۴]، استرپتومایسین ۱۰ mg/mL در NaCl ٪۰/۹

عصاره جنین جوجه

سرم اسب

سرم جنین گاو (FBS)

محیط کشت پلیتینگ : DMEM با ٪۱۰ سرم اسب، ٪ ۰/۵ عصاره جنین جوجه ، ۴ mM L-گلوتامین، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین

محیط کشت تکثیر: DMEM با ٪۲۰ FBS، ٪۱۰ سرم اسب ، ٪۱ عصاره جنین جوجه ، ۴ mM L-گلوتامین ، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین، ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین

کلاژناز نوع I

پتری دیش های ۹ cm

پی پت های پاستور اصلاح شده: پی پت های پاستور با استفاده از یک تیغه الماس بریده شده تا شکافهایی با اندازه های مختلف تولید کرده و سپس با استفاده از شعله لبه های آن صاف شده تا از آسیب به رشته های عضلانی جلوگیری شود.

پلیت های ۲۴ خانه که با ۱ mg/mL ماتریژل در DMEM پوشیده شده و به مدت ۶۰-۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه شده تا ماتریژل تبدیل به ژل شود.

غیر استریل:

تیغه برش الماس

حمام آب شیکردار در دمای ۳۵ °C

استریو میکروسکوپ تشریح ترانس لومینه

سرم جنین گاو

دستور کار

بلافاصله پس از کشتن حیوان، عضله ها را تشریح کرده و مراقب باشید که ماهیچه ها را از محل تاندون ها دستکاری کنید تا آسیب به رشته های عضلانی به حداقل برسد.

۱-عضله ها را در کلاژناز نوع I (w/v) ٪ ۰/۲ در DMEM قرار داده و در حمام آب شیکردار در دمای $35\ ^{\circ}C$ به مدت ۹۰-۶۰ دقیقه انکوبه کنید. عضلات بزرگتر به زمان هضم طولانی تری نیازمند می باشند. به عنوان یک راهنمای کلی عضله یک موش ۸-۶ هفته ای به ۶۰ دقیقه زمان نیاز دارد.

۲-پتری دیش ها را با سرم اسب آبکشی کرده تا از چسبیدن رشته های عضلانی به دیش ممانعت شده و ۲۰ mL از DMEM به آن اضافه کنید.

۳-بعد از هضم، عضله را به پتری دیش حاوی DMEM انتقال دهید.

۴-در زیر استریومیکروسکوپ تشریح ترانس لومینه با سایش متوالی عضله با یک پی پت پاستور اصلاح شده، رشته های عضلانی منفرد را آزاد کنید. پی پت ها را در ٪ ۱۰ سرم اسب در DMEM شستشو شده تا از اتصال رشته های عضلانی به شیشه ممانعت شود.

۵-هنگامی که رشته های عضلانی آزاد می شود، قطر عضله کاهش یافته و از پی پت های پاستور دارای دهانه تنگ تر استفاده می شود.

۶-هنگامی که ۳۰-۲۰ رشته عضلانی آزاد شد، عضله به یک پتری دیش تازه انتقال داده شده و رشته های عضلانی بیشتری آزاد شده تا زمانی که تعداد کافی جدا شود.

۷-عضله های بزرگتر ممکن است به یک مرحله هضم دیگر هم نیاز داشته تا بعد از جداسازی رشته های عضلانی سطحی، رشته های عضلانی موجود در مرکز هم آزاد شوند. بنابراین عضله باقیمانده را برای هضم بیشتر به کلاژناز باز گردانید.

۸-رشته های عضلانی را روی پلیت های کشت پوشیده شده با ماتریژل کشت دهید.

a)رشته های عضلانی منفرد را در مرکز چاهک قرار داده و اجازه دهید که به ماتریژل بچسبند. برای اطمینان از خالص بودن نمونه ها، فقط باید رشته های آسیب ندیده کشت شوند.

b)محیط کشت پلیتینگ را آهسته به چاهک اضافه کرده و مراقب باشید رشته عضلانی کشت داده شده برهمزده نشود.

۹- پلیت ها را در یک انکوباتور در دمای $37\ ^{\circ}C$ و ٪ ۵ CO_2 قرار دهید.

تکثیر:

سلول های ماهواره ای بعد از ۲۴-۱۲ ساعت در کشت شروع به مهاجرت از رشته عضلانی اولیه می کنند. در عرض ۴-۳ روز هر رشته عضلانی توسط تقریباً ۳۰۰-۵۰ سلول احاطه خواهد شد که تعداد دقیق سلول ها به تعدادی از عوامل از جمله عضله ای که رشته عضلانی از آن منشأ گرفته و سن موش دهنده بستگی دارد.

۱۰- وقتی تعدادی از سلو لها از رشته عضلانی مهاجرت کردند، رشته عضلانی را با یک پی پت پاستور از کشت بردارید.

۱۱- به کشت سلول های باقیمانده در چاهک اولیه ادامه دهید.

۱۲- در صورت نیاز واکشت داده و در محیط کشت تکثیر، کشت دهید.

تمایز: با کاهش میزان سرم محیط کشت تا ٪۵ سرم اسب در DMEM می توان سلول عضلانی در حال تکثیر را وادار به تمایز به لوله های عضلانی کرد. میوژنیسته سلول هایی که از رشته های عضلانی مهاجرت می کنند را می توان با رنگ آمیزی ایمنولوژیکی (immunostainig) دسمین، یک پروتئین اختصاصی فیلامانهای حد واسط عضله، بررسی کرد.

رشته های عضلانی منفرد را می توان از عضله های موش تراریخت (transgenic) $H\text{-}2K^b\text{-}tsA58$ بدست آورد تا سلول های عضلانی قادر به تعداد زیادی تقسیم در *in vitro* حاصل شود. موش تراریخت $H\text{-}2K^b\text{-}tsA58$ دارای موتانت حساس به حرارت tsA58 آنتی ژن T بزرگ ویروس SV40 تحت کنترل یک پروموتور القاءپذیر($H\text{-}2K^b$)می باشد. پروتئین tsA58 در دمای $33\ ^{\circ}C$ فعال بوده و با افزودن اینترفرون گاما موشی می توان نسخه برداری را تحریک کرد. سلول های عضلانی که از این موش منشأ می گیرند، در حضور اینترفرون گاما موشی (۲۰ واحد در میلی لیتر) در دمای $33\ ^{\circ}C$ تکثیر می شوند. وقتی در غیاب اینترفرون گاما دما به $^{\circ}C$ ۳۹-۳۷ برسد، خواه در کشت یا در پیوند در *in vivo* ، سلولها به صورت سریع و هماهنگ به شکل رشته های عضلانی تمایز می یابند.

غضروف

کندروسیت ها، سلول های بسیار تخصصی با منشأ مزانشیمی بوده که مسئول ساخت، حفاظت و تجزیه بافت غضروف می باشند. تحقیقات زیادی در زمینه روماتولوژی بر روی تشخیص مکانیسم هایی که تغییرات متابولیک را در کندروسیت های مفصلی در طی اوستئوآرتریت و آرتریت روماتوئید القاء می کند، صورت پذیرفته است. کندروسیت های مفصلی در کشت یک ابزار بسیار مفید می باشند، اما آنها در کشت تک لایه به سرعت تقسیم شده و فیبروبلاستی می شوند و ویژگی های بیوشیمیایی خود را از دست می دهند.

بلافاصله در اولین پاساژ یک تغییر جهت تدریجی از ساخت کلاژن نوع II به کلاژن های انواع I و III و از اگریکان به پروتئوگلیکانهای با وزن مولکولی کم وجود دارد. به موازات تغییر فنوتیپی، با واکشت دادن، پاسخ متابولیک به اینترلوکین – $\beta 1$ هم از لحاظ کمیت تحت تأثیر قرار می گیرد.

در میان روش های مختلفی که برای حفاظت از فنوتیپ کندروسیت ها استفاده می شود، به نظر می رسد که کشت در میان دانه های آلژینات به دلیل ایجاد یک قالب مشابه با غضروف مفصلی طبیعی، از همه بیشتر امید بخش می باشد. این سیستم بیان فنوتیپ تمایز یافته را حفظ کرده و همچنین قادر است که آن را مجدداً به کندروسیت های تمایز نیافته تبدیل کند. مزیت دیگر این روش بر روش های سه بعدی دیگر این است که این سلول ها را می توان به آسانی بعد از این که کشت کامل شد بازیابی کرد که امکان مطالعه بیان ژن و پروتئین را فراهم می سازد.

دستور کار۱۵-۱۵- کندروسیت ها در دانه های آلژینات

طرح کلی

کشت در دانه های آلژینات بر اساس سفت شدن (the gelation) سوسپانسیونی از کندروسیت ها در کلرید کلسیم در یک محلول آلژینات می باشد.

مواد

استریل:

محیط کشت تشریح غضروف (CDM) : محیط کشت Ham's F12 که با netilmycin (۲۰ µg/mL)، وانکومایسین (۱۰µg/mL) و سفتازیدیم (۳۰ µg/mL) تکمیل شده است و برای تشریح مفاصل و برداشت غضروف و همچنین هضم آنزیم استفاده می شود.

محیط کشت رشد: DMEM (گلوکز ۱ g/L) و Ham's F12 (به نسبت حجمی ۱:۱) ، جنتامایسین ۴ µg/mL که با ٪۱۰ FCS تکمیل شده است.

نکته) بچ های مختلف سرم باید ازلحاظ توانایی حمایت از رشد کندروسیت و همچنین بیان فنوتیپ تمایز یافته (به عنوان مثال با نشان دار کردن به روش ایمنی کلاژن نوع II) مقایسه شوند. وقتی یک سری انتخاب شد، برای جلوگیری از تغییر مداوم بچ های سرم، برای استفاده چند ماه ذخیره تهیه شود.

محلول آنزیمی برای تفکیک غضروف:

a) تریپسین ٪ ۰/۰۵ ، پانکراس خوکی در Ham's F12

b) کلاژناز ٪ ۰/۳ نوع I در Ham's F12

c) کلاژناز ٪ ۰/۰۶ در Ham's F12 + ٪ ۱۰ FCS

تمام محلول ها با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ µm استریل می شوند.

نکته) بچ های جدید کلاژناز از نظر جداسازی مؤثر غضروف باید با مقایسه با بچ قبلی آزمایش شوند.

محلول تریپسین-EDTA (برای واکشت): تریپسین پانکراس خوکی ٪۰/۱ w/v در PBSA با 5 mM EDTA (٪ ۰/۰۲ w/v)

محلول آلژینات سدیم: آلژینات سدیم ٪۱/۲۵ w/v در ۲۰ mM HEPES؛ ۰/۱۵ M NaCl

روش تهیه:

a) ابتدا با استفاده از یک هیتر همزن دار، HEPES را در ۰/۱۵ M NaCl حل کرده و تا دمای حدود ۶۰°C گرم کنید.

b) سدیم آلژینات را افزوده و به همزدن ادامه داده تا به طور کامل حل شود(بیش از ۲ ساعت).

c) با دقت pH محلول را با ۱ M NaOH در ۷/۴ تنظیم کنید. pH بالاتر از ۷/۴ نشود زیرا افزودن اسید (HCl یا H_2SO_4) به طور برگشت ناپذیر منجر به ایجاد رسوب می شود.

d) محلول را در ظروف کوچک توزیع کرده و در دمای ۱۲۱ °C به مدت ۱۰ دقیقه اتوکلاو کنید.

روش دیگر تهیه: آلژینات سدیم را می توان سریعاً (حدود ۱۰ دقیقه) با استفاده از یک آون میکروویو در HEPES/NaCl حل کرد اما باید مراقب بود تا از کاراملی شدن (caramelization) ممانعت شود.

محلول انعقاد (gelation) ۱۰۲ mM $CaCl_2$ ، HEPES ۵ mM ، pH ۷/۴

محلول حل کننده: ۵۰mM EDTA، ۱۰mM HEPES، pH ۷/۴

دانه مغناطیسی استریل

دستور کار

تشریح:

۱-کشت هایی از مفاصل زانو، شانه و ران آماده کنید. نمونه های جنینی یا جوان نسبت به نمونه های افراد بالغ ترجیح داده می شوند زیرا آنها مقادیر بیشتری از سلول ها را فراهم کرده و زمان بیشتری طول می کشد تا پیر شوند. خرگوش های Fauve de Bourgogne یا نیوزلندی یک ماهه برای این کار بهینه می باشد. هر چند غضروف های ران که در برش های جراحی از انسان های بالغ بدست می آید نیز منابع مناسبی از کندروسیتها می باشند.

۲-قطعات بافت را قبل از تشریح کاملاً با CDM شستشو دهید. تشریح باید بدون تأخیر شروع شود. پوست، عضله و تاندون ها را از غضروف ها جدا کنید. قطعات غضروفی که فاقد بافت همبند می باشند را با دقت از مفصل بردارید.

تفکیک:

برای جلوگیری از خشک شدن غضروف، کلیه مراحل جداسازی را در دیش های ۱۰ cm که برای کشت بافت تیمار

نشده اند و حاوی CDM می باشند، انجام دهید. مقادیر محلول های آنزیمی که در بقیه دستور کار ذکر شده است برای مفاصل ساقی رانی و شانه ای بازویی(scapulohumeral tibio femoral and) مربوط به یک خرگوش مناسب است اما این مقادیر باید بر حسب مقدار غضروفی که باید جداسازی شود تنظیم شود.

۳-با استفاده از یک اسکالپل صلیبی قطعات غضروف را به تکه های $1\ mm^3$ برش دهید.

۴-قطعات غضروف را به یک ویال ته صاف ۳۰ mL انتقال دهید.

۵-۱۰ mL از محلول تریپسین ٪۰/۰۵ رابه آن اضافه کرده و قطعات را به مدت ۲۵ دقیقه با دور گردش ملایم بر روی همزن مغناطیسی در یک ویال سر پوشیده در درجه حرارت اتاق انکوبه کنید.

۶-بعد از این که قطعات رسوب کردند محلول تریپسین را خارج کنید.

۷-۱۰ mL محلول کلاژناز ٪۰/۳ به نمونه ها افزوده و کشت را با دور گردش ملایم بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۳۰ دقیقه در یک ویال سر پوشده در درجه حرارت اتاق انکوبه کنید.

۸-پس از این که قطعات رسوب کردند محلول کلاژناز را خارج کنید.

۹-۱۰ mL از محلول کلاژناز ٪ ۰/۰۶ اضافه کنید.

۱۰- سوسپانسیون را به یک دیش باکتریایی ۱۰۰ mm انتقال دهید. ویال را با ۱۰ mL دیگر از محلول کلاژناز ٪۰/۰۶ شستشو داده و سپس سوسپانسیون حاصل را به دیش انتقال داده و قطعات غضروف را به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C در یک انکوباتور حاوی ٪۵ CO_2 انکوبه کنید.

۱۱- سوسپانسیون سلولی را به یک لوله سانتریفوژ ۵۰ mL انتقال داده و بر روی یک مخلوط کننده ورتکس برای چند ثانیه مخلوط کنید.

۱۲- مواد پس مانده حاصل از هضم را با عبور مواد هضم شده از یک فیلتر نایلونی‌µm ۷۰ خارج کنید.

۱۳-سوسپانسیون فیلتر شده را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفوژ کنید.

۱۴-رسوب سلولی را مجدداً در ۲۰ mL از CDM به حالت تعلیق در آورده و سلول ها را با هموسیتومتر شمارش کنید.

۱۵-سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ g سانتریفوژ کنید.

Entrapment:

۱۶- رسوب سلولی را مجدداً در 1mL از محلول آلژینات سدیم به حالت تعلیق در آورده و سپس سوسپانسیون را به صورت تدریجی در محلول آلژینات سدیم بیشتری رقیق کنید تا به یک دانسیته سلولی 2×10^6 سلول در میلی لیتر برسد. این رقیق سازی تدریجی برای بدست آمدن سوسپانسیون سلولی یکنواخت در آلژینات ضروری می باشد.

۱۷-سوسپانسیون سلولی را توسط یک سوزن G ۲۱ به صورت قطره قطره در محلول ژله ای با همزنی ملایم بر روی همزن مغناطیسی وارد کنید و اجازه دهید به مدت ۱۰ دقیقه آلژینات پلی مره شده تا دانه ها تشکیل شوند.

۱۸-دانه ها را ۳ بار در ۵ حجم ۰/۱۵ M NaCl شستشو دهید.

۱۹-۵ mL از دانه ها (1×10^7 سلول) را در فلاسک های ۷۵ cm^2 حاوی ۲۰ mL محیط کشت رشد توزیع کنید.

۲۰- کشت را در دمای ۳۷ °C در یک محیط مرطوب حاوی ٪ ۵ CO_2 و ٪ ۹۵ هوا انکوبه کنید.

بازیافت:

۲۱-محیط کشت را دور بریزید.

۲۲-۲ حجم از محلول حل کننده را به دانه ها اضافه کنید.

۲۳-کشت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید.

۲۴-سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰g سانتریفوژ کنید.

۲۵-رسوب سلولی را دوباره در محیط کشت رشد حاوی ٪ ۰/۰۶کلاژناز به حالت تعلیق در آورید.

۲۶-سلول ها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در یک محیط مرطوب حاوی ٪۵ CO_2 و ٪ ۹۵ هوا انکوبه کنید.

۲۷-سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۲۸-رسوب سلولی را مجدداً در محیط کشت DMEM/Ham's F12 فاقد سرم به حالت تعلیق در آورده و سلول ها را با یک هموسیتومتر شمارش کنید.

۲۹-سلول ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۳۰-مراحل ۲۸ و ۲۹ را بدون شمارش کردن سلول ها تکرار کنید.

تجزیه و تحلیل فنوتیپ کندروسیت

کلاژن: کلاژن نوع II، ٪ ۹۰ -۸۵ از کل کلاژن ساخته شده توسط کندروسیت ها در غضروف یا کشت اولیه را شامل می شود. کلاژن نوع II برای کندروسیت ها بسیار اختصاصی بوده و به عنوان نشانگر اصلی تمایز آنها محسوب می شود. بیان کلاژن نوع II را می توان با روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی بررسی کرد. هر چند باید این کار خیلی با دقت بررسی شده تا اطمینان حاصل شود که هیچگونه واکنش متقاطع با کلاژن نوع I که توسط سلولهای تمایز نیافته بیان می شود، وجود ندارد.

برای بررسی دقیق تر فنوتیپ کلاژن باید SDS-PAGE و نقشه های پپتیدی CNBr دو بعدی کلاژن خالص شده بعد از ترکیب با $[^3H]$- پرولین انجام شود.

در مورد بیشتر کلاژن ها، بررسی های SDS-PAGE می تواند حضور کلاژن نوع III و زنجیره α2(I) کلاژن I را آشکار کند. هر چند قادر به جداسازی زنجیره α1 نوع I و نوع

II نمی باشد(یعنی نمی تواند تمایزی بین نوع I و نوع II تریمر قائل شود)، به همین دلیل می باشد که تهیه نقشه پپتیدی CNBr دو بعدی برای اثبات بیان کلاژن نوع II لازم می باشد.

همچنین می توان بیان این کلاژن هایی که از لحاظ ژنتیکی مجزا می باشند را در سطح نسخه برداری (نورترن بلات) با انتقال معمولی و تکنیک های دو رگه سازی بررسی کرد. به دلیل تشابه توالی میان ژنهای کلاژن های مختلف، شرایط دو رگه سازی و شستشو دادن باید آزمایش شود و لازم است به اندازه کافی دقیق بوده تا از دو رگه سازی متقاطع (cross hybridization) جلوگیری شود.

پروتئوگلیکانها: رنگ آمیزی Alcian Blue در pH اسیدی به صورت وسیعی به عنوان یک شاخص حضور اگریکان سولفاته استفاده می شود. همانند مطالعات ایمنوسیتوشیمی (immunocytochemical) ، این رنگ آمیزی نیازمند برش دادن دانه ها می باشد . یک بررسی دقیق تر در مورد انواع مختلف پروتئوگلیکانهای ساخته شده را می توان بعد از ترکیب با $^{35}SO_4$ انجام داد. پروب های cDNA برای اگریکان و پروتئین اتصال امکان یک بررسی در سطح نسخه برداری بیان این پروتئین های اختصاصی را فراهم می سازد.

تغییرات و کاربردها: چندین بررسی نشان داده است که کندروسیت های کشت یافته در دانه های آلژینات یک مدل مناسب برای کندروسیت ها می باشد. مهمترین مزیت این روش در مقایسه با روش های سه بعدی دیگر این است که می توان به راحتی سلول ها را بعد از کشت بازیابی کرد که امکان انجام مطالعات بیان ژن و پروتئین را فراهم می سازد.

اغلب، تعداد سلول های موجود یک عامل محدود کننده در مطالعات متابولیسم کندروسیت می باشد زیرا تولید مقادیر زیادی از غضروف مفصلی مشکل می باشد . در این مورد می توان تعداد کندروسیت های موجود را با کشت دادن اولیه به صورت تک لایه (۲ پاساژ) و سپس بازیابی خصوصیات تمایز یافته کندروسیت ها با کشت دادن سلول ها به مدت دو هفته در دانه های آلژینات تکثیر کرد. همسو با این تجدید فنوتیپی، پاسخ متابولیکی این سلول ها نسبت به اینترلوکین-۱ β از نظر کمی مشابه با کندروسیت ها در یک کشت اولیه تک لایه حفظ می شود. این امر کشت بر روی دانه های آلژینات را به یک مدل مناسب برای مطالعه زیست شناسی کندروسیت تبدیل کرده است. بعلاوه داربست هایی که از کندروسیت های موجود در ژل آلژینات تهیه می شوند برای پیوند و مهندسی بافت غضروفها طراحی شده اند.

استخوان

هر چند دستکاری مکانیکی استخوان مشکل می باشد، برش های نازک تیمار شده با EDTA که با کلاژناز هضم شده اند، باعث تولید کشت هایی از استئوبلاست ها می شود که بعضی از خصوصیات عملکردی بافت را دارا می باشند. آنتی سرم ضد کلاژن برای جلوگیری از رشد بیش از حد فیبروبلاستی بدون این که از رشد استئوبلاستها ممانعت کند مورد استفاده قرار می گیرد. رده های تکثیر یافته از سارکومای استخوان(osteosarcoma) بدست آمده است اما از استئوبلاستهای طبیعی حاصل نمی شود.

کشت استخوان به دلیل ماهیت سخت بافت استخوانی دارای این مشکل ذاتی است که دستکاری آن را مشکل می سازد. هر چند کشت اکسپلنت اولیه متعارف یا هضم با کلاژناز و تریپسین، سلول هایی را آزاد کرده که ممکن است با یک روش معمولی پاساژ یابند.

دستور کار۱۶-۱۵- استئوبلاست ها

مواد

استریل:

محیط کشت Ham's F12 با ٪ ۱۲ سرم جنین گوساله، Mg^{2+} ۲/۳ mM، ۱۰۰ U/mL پنی سیلین و ۱۰۰ µg/mL سولفات استرپتومایسین

محلول تریپسین مورد استفاده برای پاساژ سلولی: ۱۲۵ mg تریپسین را در ۵۰ mL محلول Tyrode فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+} حل کنید . محلول را به pH ۷ رسانده و آنرا با فیلتر استریل کنید. مقادیر ۵ mL و ۱۰ mL را در لوله های پیرکس توزیع کرده و در دمای ۲۰- °C نگهداری کنید.

محلول هضم برای جداسازی استئوبلاستها:

محلولA : ۸ گرم NaCl ، ۰/۲ گرم KCl ، ۰/۰۵ گرم $NaH_2PO_4.H_2O$ در ۱۰۰ mL از UPW

محلول B: (محلول کلاژناز – تریپسین): ۱۳۷ mg کلاژناز و ۵۰ mg تریپسین را در ۱۰ mL از محلول A حل کنید. محلول مخلوط شده را تا pH ۷/۲ تنظیم کرده و سپس حجم آن را با UPW به ۱۰۰ mL برسانید. محلول را با فیلتر استریل کرده و آن را در مقادیر ۱۰ mL توزیع کرده و در دمای ۲۰- °C نگهداری کنید.

پتری دیش های ۹ cm

فلاسک های ۲۵ یا ۷۵ cm^2

اسکالپل

پنس

دستور کار A – کشت های اکسپلنت

۱-نمونه های استخوان را از اتاق جراحی بدست آورید.

۲-بافت را چندین بار با سالین استریل در درجه حرارت اتاق شستشو دهید.

۳-اگر نمی توان بلافاصله از استخوان استفاده کرد، سطح استخوان را با محیط کشت استریل Ham's F12 حاوی ۱۲٪ سرم جنین گوساله، پنی سیلین و سولفات استرپتومایسین بپوشانید. استخوان را می توان به مدت یک شب در دمای $4\ ^\circ C$ نگهداری کرد.

۴-صبح روز بعد، بافت را با محلول Tyrode حاوی پنی سیلین (۱۰۰ U/mL) و سولفات استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) شستشو دهید.

۵-استخوان را در یک پتری دیش قرار داده و با استفاده از اسکالپل و پنس، باریکه ها (trabeculae) را بیرون آورده و آنها را در یک پتری دیش دیگر قرا دهید.

۶-۱۰ mL محلول Tyrode روی باریکه های بریده شده اضافه کنید . باریکه ها را چندین مرتبه با محلول Tyrode شستشو داده تا سلول های خونی و چربی برطرف شوند.

۷-برای شروع کشت های اکسپلنت، یک فلاسک ۲۵ cm^2 را با پیش تیمار آن با ۲ mL محیط کشت کامل به مدت ۲۰ دقیقه آماده کرده تا محیط کشت با فاز گازی به تعادل برسد. در صورت نیاز pH را با ۴/۵٪ CO_2، $NaHCO_3$ یا HCl تنظیم کنید.

۸-باریکه را به قطعات ۳-۱ mm برش دهید.

۹-محیط کشت پیش تیمار را از فلاسک خارج کرده و ۲/۵ mL محیط کشت Ham's F12 تازه به فلاسک اضافه کنید.

۱۰-بین ۲۵ تا ۴۰ قطعه از باریکه را به فلاسک انتقال دهید.

۱۱-با قرار دادن فلاسک در حالت ایستاده، تکه های اکسپلنت را در امتدا ته با کمک یک لوپ تلقیح حرکت داده و تکه های اکسپلنت را به طور یکنواخت توزیع کنید.

۱۲-اجازه دهید که فلاسک به مدت ۱۵ دقیقه در دمای $37\ ^\circ C$ به حالت ایستاده باقی بماند.

۱۳- آهسته فلاسک را به حالت افقی خود بازگردانید. تکه های اکسپلنت به ته فلاسک خواهند چسبید.

۱۴ - فلاسک را در دمای $37\ ^\circ C$ به مدت ۵ تا ۷ روز در وضعیت افقی قرار دهید. پس از این مدت، فلاسک را از لحاظ برون رشد بررسی کرده و محیط کشت درون فلاسک را با محیط کشت جدید جایگزین کنید. برای ممانعت از جداسازی تکه های اکسپلنت، قبل از حمل آن از انکوباتور به هود یا میکروسکوپ، آن را آهسته در حالت عمودی قرار دهید.

۱۵- برای نگهداری کشت ها، محیط کشت آنها را هفته ای دو بار تعویض کنید.

۱۶- وقتی به حالت تراکم رسید، قطعات اکسپلنت خارج شده، لایه سلولی تریپسینه شده و سلول ها با سانتریفوژ جداسازی می شوند و سپس در فلاسک ها یا چاهک ها بذرافشانی می شوند.

دستور کار B - کشت های تک لایه از سلول های جداسازی شده

۱-نمونه های استخوان باریکه ای(trabecular) را چندین بار با محلول Tyrode شستشو داده تا سلول های چربی و خونی برطرف شوند. باریکه ها تحت شرایط استریل با اسکالپل و پنس برش داده می شوند.

۲-بعد از جمع آوری حداکثر مقدا ممکن استخون، با سه بار شستشوی نمونه ها با محلولTyrode، باقیمانده سلول های چربی و خون را خارج کرده و سپس آن را به قعات ۵-۲ mm برش دهید.

۳-باریکه های بریده شده را با محیط کشت F12 حاوی FCS شستشودهید.

۴-تکه های استخوان را در یک بطری استریل کوچک بر روی یک همزن مغناطیسی قرار داده و ۴ mL محلول هضم به آن اضافه کنید (این مقدار باید نمونه های استخوان را بپوشاند).

۵-محلول حاوی قطعات استخوان را در درجه حرارت اتاق به مدت ۴۵ دقیقه همزنی کنید.

۶-سوسپانسیون سلول های آزاد شده را خارج کرده و آن را دور بریزید، چون به احتمال زیاد این سلول ها حاوی فیبروبلاستها می باشند.

۷- ۴ mL دیگر از محلول هضم به قطعات استخوان اضافه کرده و مخلوط را در درجه حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه همزنی کنید.

۸-محلول هضم را از قطعات استخوان جمع آوری کرده و آن را در درجه حرارت اتاق به مدت ۲ دقیقه در ۵۸۰ g سانتریفوژ کنید.

۹-بعد از خارج کردن سوپرناتانت، سلول ها را در ۴ mL از محیط کشت Ham's F12 دارای ۲۰٪ FCS به حالت تعلیق در آورده و سلول ها را شمارش کنید.

۱۰-سوسپانسیون را به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۸۰ g سانتریفوژ کرده و مجدداً سلول ها را در ۴mL محیط کشت کامل به حالت تعلیق در آورید. این سوسپانسیون ماده تلقیح خواهد شد.

۱۱-یک فلاسک ۷۵ cm^2 را به مدت ۲۰ دقیقه با ۸ mL از محیط کشت F12 کامل پیش تیمار کرده تا با فاز گازی به تعادل برسد.

۱۲-محیط کشت پیش تیمار را خارج کرده و به آن ۲ mL محیط کشت F12 کامل اضافه کنید.

۱۳- ۴ mL از محیط کشت حاوی سوسپانسیون سلولی را اضافه کنید. تلقیح باید حاوی ۶۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول در هر cm^2 از سطح باشد.

۱۴-در نهایت، ۶mL دیگر از محیط کشت Ham's F12 اضافه کرده تا حجم کلی به ۱۲ mL برسد.

۱۵-در همین مدت، ۴ mL محلول هضم دیگر به قطعات باقیمانده استخوان افزوده و هضم را به مدت ۳۰ دقیقه تکرار کنید. سلول های آزاد شده جمع آوری شده و در صورت نیاز، مرحله هضم چندین بار دیگر هم تکرار می شود. در مورد مقادیر زیاد استخوان، زمان هضم را می توان تا ۳-۱ ساعت افزایش داد. بعد از هر دوره هضم، شمارش سلولی انجام می شود و سلول های آزاد شده برای تلقیح به یک فلاسک دیگر استفاده می شوند.

پاساژ سلول ها در کشت:

۱-تکه های اکسپلنت را خارج کنید.

۲-محیط کشت را خارج کرده و لایه سلولی را با ۰/۲ mL/cm^2 از D-PBSA شستشو دهید.

۳- ۰/۱ mL/cm^2 تریپسین به فلاسک افزوده و تا زمانی که سلول ها کنده شده و از یکدیگر جدا شوند در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید. کنده شدن سلول ها و جداسازی آنها را زیر میکروسکوپ بررسی کنید. به طور کلی زمان انکوباسیون ۱۰ دقیقه کافی می باشد.

۴-سلول های آزاد شده را به همراه یک حجم مساوی از محیط کشت Ham's F12 حاوی ٪۲۰ FCS به یک لوله سانتریفوژ انتقال دهید.

۵-سلول ها را به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۶-سوپرناتانت را خارج کرده مجدداً سلول ها را با پی پتینگ ملایم و مکرر در محیط کشت کامل به حالت تعلیق در آورید.

۷-یک نمونه را برای تعیین غلظت سلولی و یک نمونه دیگر را برای تعیین DNA کنار بگذارید.

۸-سلول های باقیمانده را در فلاسک های کشت یا چاهک هایی که قبلاً با محیط کشت به حالت تعادل رسیده است، تلقیح کنید. سلول ها باید در عرض ۲۴ ساعت مجدداً متصل شوند.

اندوتلیوم

به دلیل دخالت سلول های اندوتلیال در بیماری های عروقی، ترمیم رگ های خونی و رگ زایی در سرطان، علاقه زیادی در مورد کشت سلول های اندوتلیال وجود دارد. Folkman و Haudenschild تکامل ساختمان های سه بعدی مشابه با مویرگ های خونی که از رده های اندوتلیال خالص در *in vitro* منشاء گرفته اند را توصیف کرده اند. فاکتورهای رشد شامل فاکتور رگزایی مشتق شده از سلول های Walker 256 در *in vitro* یک نقش مهم در حفظ تکثیر سلولی و بقاء ایفا کرده به گونه ایکه ساختمان های ثانویه بتوانند تشکیل شوند. کشت های اندوتلیال، مدل های خوبی برای ممانعت تماسی و محدودیت دانسیته رشد می باشند زیرا تکثیر سلولی پس از این که به حالت تراکم رسید، شدیداً ممانعت می شود. همچنین کشت سلول های اندوتلیال به صورت تجاری موجود می باشد.

سطح داخلی همه رگ های خونی از یک لایه سلولی منفرد از سلول های اندوتلیال تشکیل شده است. اندوتلیوم یک سطح صاف ضد انعقاد را فراهم کرده که در انقباض پذیری رگ های خونی دخالت داشته و به عنوان یک سد نفوذپذیر امکان انتقال مواد غذایی و گازها و همچنین مهاجرت سلول های ایمنی از خون را فراهم می سازد. سلول های اندوتلیال را می توان از رگ های خونی بزرگ مثل سیاهرگ های بند ناف انسان و آئورت خوک یا گاو جدا کرد. سلولهای اندوتلیال رگهای ریز را می توان از غده آدرنال گاو، مغز رت، پوست انسان، بافت چربی انسان و همچنین قلب انسان و موش جدا کرد.

دستور کار۱۷-۱۵- جداسازی و کشت سلول های اندوتلیال عروقی

طرح کلی

انکوباسیون لومن عروق خونی با کلاژناز، سلول های اندوتلیال را آزاد کرده که می توان آنها را برای چندین دو برابر شدن جمعیت بر روی بستر پوشیده شده با ژلاتین در یک محیط کشت رشد مناسب کشت داد. جداسازی ایمنی مغناطیسی(immunomagnetic) برای جداسازی سلول های اندوتلیال از بافت قلبی استفاده می شود.

A- جداسازی سلول های اندوتلیال از سیاهرگ بند ناف انسان (Human Umblical Vein Endothelial Cells: HUVECs)

مواد عمومی برای همه دستور کارهای اندوتلیال

استریل یا تهیه شده به طریق آسپتیک:

D-PBSA روی یخ

HBSS : محلول نمکی متعادل شده Hank

HBSS/PSG حاوی ۳۰۰ U/mL پنی سیلین، ۳۰۰ µg/mL استرپتومایسین و ۵۰ µg/mL جنتامایسین

تریپسین ۵۰۰ µg/mL، ۵ mM EDTA (٪ ۰/۲)

فلاسک های کشت ۲۵ cm^2 که با ژلاتین ٪ ۰/۵ پوشیده شده اند

محلول ٪۲ ژلاتین نوع B از پوست گاو را ۴ برابر با D-PBSA رقیق کنید.

a) در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۰ دقیقه در فلاسک انکوبه کنید.

b) درست قبل از اضافه کردن سلول ها، ژلاتین را بردارید.

اسکالپل و تیغه شماره ۲۲

سوزن سرنگ

سرنگ ۲۰ mL

گیره های تمساح (crocodile clips)

Artery clamps

پنس

قیچی تیز

غیر استریل:

متانول ٪ ۷۰

فویل آلومینیومی

Clingfilm (یا Saran Wrap)

تخته چوب پنبه

نخ محکم

مواد برای HUVECs

بند ناف انسان در HBSS/PSG

محیط کشت رشد HUVEC: محیط کشت M199 با نمک های Hank، ۲ mM از L- گلوتامین و ۲۵ mM از HEPES که با ٪۲۰ FBS تکمیل شده است، ۱۵۰ U/mL پنی سیلین/ استرپتومایسین و مکمل رشد سلول اندوتلیال (ECGS) از مغز گاو (Roche به شماره کاتالوگ ۱۰۳۳۴۸۴، ۷۵ mg، با غلظت ۲۰ µg/mL با هپارین در غلظت ۵۰ µg/mL استفاده می شود یا Sigma به شماره کاتالوگ E2759، ۱۵ mg در غلظت ۳۰ µg/mL با هپارین در غلظت ۱۰ µg/mL استفاده می شود).

کلاژناز H: از کلوستریدیوم هیستولیتیکوم (Roche به شماره کاتالوگ ۱۰۷۴۰۵۹، در غلظت ۰/۵ mg/mL در M199 استفاده می شود و توسط فیلتر استریل می گردد)..... ۲۵ mL ....

سرم گوساله نوزاد (NBS) سرد .... ۵ mL

آداپتور ۲

دستور کار

جداسازی سلول های اندوتلیال :

۱-صفحه چوب پنبه را با فویل آلومینیومی بپوشانید.

۲-دستمال های کاغذی را روی فویل قرار داده و با دستمال های آغشته به متانول ٪۷۰ آنها را غوطه ور کنید.

۳-بند ناف را فشار داده تا خون موجود در آن خارج شود.

۴- ۲ سانتیمتر و یا بیشتر از یک انتهای بند ناف و همچنین هر گونه علایم کلامپ را جدا کنید.

۵-آداپتور Luer را در سیاهرگ قرار دهید.

۶-بند ناف را نزدیک سیاهرگ با سوزن به صفحه چوب پنبه سنجاق کنید اما مراقب باشید لومن سوراخ نشود.

۷-با استفاده از اسکالپل و پنس، سرخرگ را حدود ۲ سانتیمتر چاک دهید.

۸-رابط را توسط دو گروه با طناب در جای خود محکم کنید.

۹-طرف دیگر بند ناف را با گیره مسدود کرده، با یک سرنگ ۲۰ mL متصل به رابط تا ۲۵ mL D-PBSA وارد بند ناف کنید، بند ناف را چک کرده و هر گونه منفذ را با گیره مسدود کنید بدون این که سیاهرگ بسته شود.

۱۰- D-PBSA موجود در بند ناف را در ظرف مواد زائد تخلیه کنید.

۱۱- تقریباً ۲ cm از انتهای دیگر بند ناف را بریده و یک رابط محکم همانند مرحله ۸ در آن قرار دهید.

۱۲-با استفاده از یک سرنگ ۲۰mL دیگر، حدود ۲۵ mL کلاژناز را وارد بند ناف کرده تا زمانی که متورم شود.

۱۳-بند ناف را در Clingfilm که با متانول اسپری شده پیچیده و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار دهید.

۱۴-کلاژناز را به خارج از بند ناف و داخل سرنگ بکشید.

۱۵-سرنگ ها را بیرون آورده و کلاژناز را در لوله های حاوی ۵mL سرم گوساله نوزاد خالی کنید.

۱۶-سرنگ را در یک انتهای بند ناف قرار داده و از سرنگ دیگر برای انتقال ۲۵ mL D-PBSA به بند ناف استفاده کنید.

۱۷-برای چند لحظه بند ناف را در امتداد طول فشار داده یا به آن ضربه آهسته وارد کرده، سپس D-PBSA را به داخل سرنگ بکشید.

۱۸-آن را به محتویات لوله مرحله ۱۵ اضافه کنید.

۱۹- به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C در ۲۱۰ g سانتریفوژ کنید.

۲۰- مجدداً رسوب را در ۵ mL محیط کشت رشد HUVEC به حالت تعلیق در آورید.

۲۱- ژلاتین اضافی را از فلاسک خارج کرده و سلول های مرحله ۲۰ را به آن اضافه کنید.

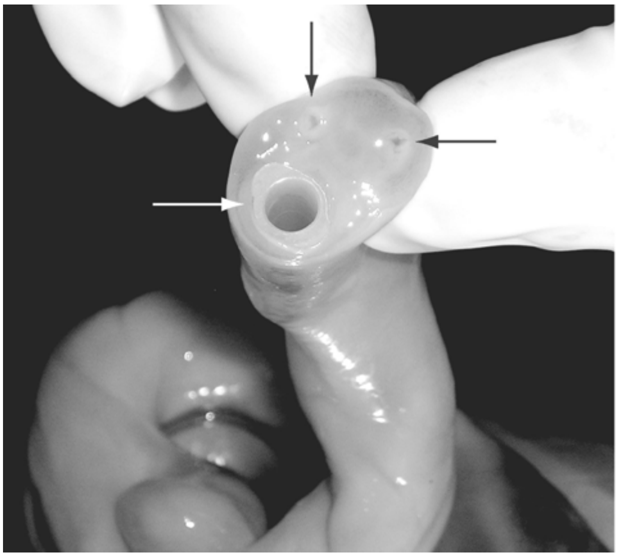
۲۲- روز بعد فلاسک را از محیط کشت خارج کرده و دور بریزید.

۲۳- دو بار با D-PBSA شستشو داده و محیط کشت رشد جدید HUVEC اضافه کنید.

نگهداری و کشت:

۲۴- هفته ای سه مرتبه نصف محیط کشت را خارج کرده و با محیط کشت جدید جایگزین کنید.

۲۵- تقریباً هفته ای یک بار با استفاده از تریپسین /EDTA با نسبت ۱:۲ در فلاسک های پوشیده شده با ژلاتین پاساژ دهید.



شکل ۱-۱۵: منظره رگ های خونی در بند ناف انسان. فلش های سیاه، سرخرگ های بند ناف و فلش سفید، سیاهرگ نافی که آداپتور Luer در آن قرار داده شده است.

۲۶- بیش از ۶ مرتبه پاساژ ندهید.

B-جداسازی سلول اندوتلیال آئورتی خوک (Porcine Aortic Endothelial Cell :PAEC)

مواد برای PAECs

HBSS/PSGA : HBSS حاوی ۳۰۰ U/mL پنی سیلین/ استرپتومایسین، ۵۰ µg/mL جنتامایسین، ۲/۵ µg/mL آمفوتریپسین B

آئورت تازه خوک (در صورت امکان در شرایط استریل جمع آوری شود) که در HBSS/PSGA انتقال می یابد.

محیط کشت رشد PAEC: محیط کشت M199 با نمک های Hank ، ۲ mM از L – گلوتامین و ۲۵ mM از HEPES که با ۱۵۰ U/mL پنی سیلین / استرپتومایسین، ۵۰ µg/mL جنتامایسین ، ۲/۵ µg/mL آمفوتریسین B ، ٪۱۰ FBS و ٪۱۰ NBBS تکمیل شده است.

کلاژناز H (همانند مواد HUVEC) .... ۵۰ mL

FBS در لوله ۵۰ mL .... ۵ mL

دستور کار

۱-صفحه چوب پنبه را با فویل آلومینیومی بپوشانید.

۲-آئورت را بر روی دستمال اسپری شده با اتانول قرار داده و به آرامی خشک کنید.

۳-بر روی صفحه پوشیده شده با فویل ، بافت اضافی را تراشیده و فقط انشعاب ها را باقی گذاشته و آنها را خیلی کوتاه نبرید.

۴-انشعاب ها را با نخ گره زده و انتهای باریک آئورت را گیره بزنید.

۵-در آن D-PBSA ریخته تا پر شود؛ بالای آنرا گیره بزنید.

۶-با گیره های تمساح استریل هر نوع منفذی را ببندید.

۷-D-PBSA را خارج سازید.

۸-داخل آئورت را با کلاژناز گرم پر کرده، دوباره به آن گیره زده و در clingfilm اسپری شده با متانول پیچیده و ۸ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید.

۹-به آرامی آئورت را ماساژ داده تا سلول ها شل شوند.

۱۰-کلاژناز موجود در آئورت را در لوله ۵۰ mL حاوی 5mL FBS بریزید.

۱۱-آئورت را با D-PBSA سرد شده در یخ پر کرده، گیره زده، ماساژ داده و سپس آن را به لوله حاوی سلول های مرحله ۱۰ اضافه کرده و این مرحله را تکرار کنید.

۱۲-سلول ها را به مدت ۶ دقیقه در دمای ۴ °C در ۵۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۱۳-رسوب سلولی را در ۵ mL محیط کشت به حالت تعلیق در آورده و در فلاسک ۲۵ cm^2 ریخته و به مدت یک شب در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید.

۱۴-روز بعد محیط کشت را از فلاسک خارج کرده و دور بریزید.

۱۵-دو بار با D-PBSA شستشو داده و محیط کشت جدید جایگزین آن کنید.

نگهداری:

۱۶-هفته ای سه بار محیط کشت را جایگزین کنید، اگر سلول ها کمتر از ٪ ۵۰ متراکم هستند فقط نیمی از محیط کشت را خارج کرده و جایگزین سازید.

۱۷-وقتی سلول ها به تراکم ٪۸۰ رسیدند، با نسبت تقسیم ۱:۳ با استفاده از تریپسین/EDTA پاساژ دهید.

۱۸- بیش از ۷مرتبه پاساژ ندهید.

C- جداسازی سلول آندوتلیال قلب موش (Murine Cardiac Endothelial Cell: MCEC)

مواد لازم برای MCECs

قلب های موش که در HBSS/PSG حاوی ۳۰۰ U/mL پنی سیلین/ استرپتومایسین و ۵۰ µg/mL جنتامایسین جمع آوری شده است.

محیط کشت رشد MCEC : DMEM با ۲۵ mM گلوکز و ۴ mM L – گلوتامین که با ٪۱۰ FBS ،

۱۵۰U/mL پنی سیلین، ۱۵۰ µg/mL استرپتومایسین و مکمل رشد سلول اندوتلیال (ECGS) مغز گاو تکمیل شده است.

محیط کشت برای سلول غیر اندوتلیال: DMEM (۱۰۰۰ mg/L گلوکز) حاوی ٪۱۵ FCS

HBSS/PS : HBSS با ۱۵۰ U/mL پنی سیلین، ۱۵۰ µg/mL استرپتومایسین

HBSS/FB : HBSS با ٪۱ FBS

CMF: HBSS بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} با ۱۵۰ U/mL پنی سیلین، ۱۵۰ µg/mL استرپتومایسین

تریپسین/ EDTA

FBS

کلاژناز A : از کلوستریدیوم هیستولیتیکوم ؛ با غلظت ۱ mg/mL در HBSS استفاده شود. تازه تهیه شده و با فیلتر استریل گردد.. ۱۰ mL

صافی سلولی با منافذ ۷۰ µm

پتری دیش های ۹ cm

آنتی بادی های کنترل مثل OKT4 ضد CD4 انسان ۵ µg

آنتی بادی endoglin رت ضد موش(CD105)، کلون MY7/18 .... ۵ µg

Microbead های ایمنوگلوبولین بزغاله ضد رت

واحد جداسازی MidiMacs

ستون LS MACS

دستور کار

۱- قلب ها را در پتری دیش های حاوی حدود ۵ mL از HBSS/PS قرار دهید.

۲- آئورت، سرخرگ ریوی و قسمت های دیگر را از قلب خارج سازید.

۳- قلب را نصف کرده و هر گونه لخته خون بزرگ و بافت همبند را خارج کنید.

۴- قلب ها را در پتری دیش های تازه دارای CMF شستشو داده و سپس CMF تازه جایگزین کنید.

۵- مواد موجود در دیش را با اسکالپل به قطعات کوچک برش دهید.

۶- با تعلیق مجدد و ته نشینی در CMF شستشو دهید.

۷- با اسکالپل بافت را تراشیده و به لوله حاوی ۱۰ mLکلاژناز A گرم تازه تهیه شده با غلظت ۱ mg/mL انتقال دهید.

۸- به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C در حالت همزنی انکوبه کنید.

۹- CMF را اضافه کنید.

۱۰- سلول ها را با تکان دادن پخش کرده و سپس اجازه دهید تا ته نشین شوند. سوسپانسیون سلولی را خارج کرده و به یک لوله جدید انتقال دهید.

۱۱- مرحله ۱۰ را چندین مرتبه تکرار کنید.

۱۲- سوسپانسیون سلولی را به مدت ۸ دقیقه در ۳۰۰ g اسپین کنید.

۱۳- با دقت سوپرناتانت را از روی رسوب سلولی ست بردارید.

۱۴- رسوب سلولی را مجدداً در ۵ mL تریپسین / EDTA به حالت تعلیق در آورده، سعی کنید با پی پتینگ کردن، هر گونه توده سلولی را شکسته و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید.

۱۵- ۱۰ mL HBSS/FB حاوی ٪۱ FBS به سلول ها اضافه کرده و از طریق یک صافی سلولی ۷۰ µm آن را صاف کنید.

۱۶- بافت موجود در صافی سلولی را با ۲۰ mL از HBSS/FB سرد شستشو دهید.

۱۷- سلول ها حاصل از فیلتر کردن را به مدت ۸ دقیقه در ۳۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۱۸- با دقت سوپرناتانت را خالی کرده و دور بریزید و رسوب سلولی را نگه دارید.

۱۹- تقریباً ۵ µg آنتی بادی نامربوط (irrelevant antibody) (مثل (OKT4/OKT8) به رسوب سلولی اضافه کرده، لوله را تکان داده تا رسوب پخش شود و به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ انکوبه کنید.

۲۰- ۵ µg از endoglin رت ضد موشی به رسوب سلولی اضافه کرده، لوله را تکان داده(کلونMY 7/18) و در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه کنید.

۲۱- ۳۰ mL HBSS اضافه کرده و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ °C در ۳۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۲۲- ۵۰ mL bead های ضد رت بزغاله در ۲۰۰ µL HBSS اضافه کنید.

۲۳- به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C انکوبه کنید.

۲۴- ۳۰ mL HBSS اضافه کرده و به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ °C در ۳۰۰ g سانتریفوژ کنید.

۲۵- ستون MidiMacs را روی مگنت قرار داده و با ۵۰۰ µL از FCS ٪۱ / HBSS بر اساس توصیه شرکت سازنده شستشو دهید.

۲۶- ۳ mL از FBS ٪۱ /HBSS به رسوب سلولی اضافه کرده و به ستون اضافه کنید.

۲۷- ستون را سه مرتبه با ۱ mL از HBSS/FB و در نهایت با ۵۰۰ µL محیط کشت رشد شستشو دهید.

۲۸- ستون را خارج کرده و در لوله ۱۵ mL قرار داده، ۴ mL محیط کشت رشد MCEC افزوده و پیستون را داخل گذاشته تا سلول های متصل به bead جمع آوری شوند.

۲۹- برای نگهداری جمعیت سلول ها غیر اندوتلیال ، مایع حاصل از شستشوی ستون را اسپین کرده و در فلاسک

۲۵ cm^2 در DMEM (۱۰۰۰ mg/L گلوکز) حاوی ٪ ۱۵ FBS کشت دهید.

نگهداری:

۳۰- هفته ای دو بار محیط کشت را جایگزین کنید. اگر سلول ها کمتر از ٪ ۵۰ تراکم دارند، فقط نصف محیط کشت را خارج کرده و جایگزین سازید. اگر سلول ها ٪ ۸۰-۵۰ تراکم دارند، تمام محیط کشت را خارج کرده و جایگزین سازید.

۳۱- وقتی سلول ها دارای تراکم ٪۸۰ می باشند با تریپسین /EDTA با یک نسبت تقسیم ۱:۳ پاساژ دهید.

۳۲- بیش از سه بار پاساژ ندهید.

D- جداسازی سلول های اندوتلیال قلبی انسان (Human Cardiac Endothelial Cell: HCEC)

امکان جداسازی CEC از بطن چپ انسان وجود دارد.

مواد لازم برای HCEC

دانه های مغناطیسی پوشیده شده با آنتی بادی های MHC کلاس II انسان یا CD31 انسان.

محیط کشت رشد HCEC : M199 با ۴ mM L – گلوتامین که با ٪۱۰ FBS ، ٪۱۰ سرم AB انسان مذکر، ۱۵۰ U/mL پنی سیلین، ۱۵۰ µg/mL استرپتومایسین و ECGS همانند دستور کار A تکمیل شده است.

کلاژناز II، ۱mg/mL

دستور کار

۱- دستور کار C را انجام دهید.

۲- بافت را در مرحله ۷ با کلاژناز II (Roche) هضم کنید.

۳- از دانه های مغناطیسی دارای پوشش آنتی بادی MHC کلاس II انسانی یا CD31 انسانی استفاده کرده تا سلول های اندوتلیال را همانند مرحله ۲۰ C انتخاب کرده و همانند مرحله ۲۳ C به پیش بروید.

۴- hCEC را در محیط کشت رشد HCEC نگهداری کنید.

سلول های Neuroectodermal

نرونها

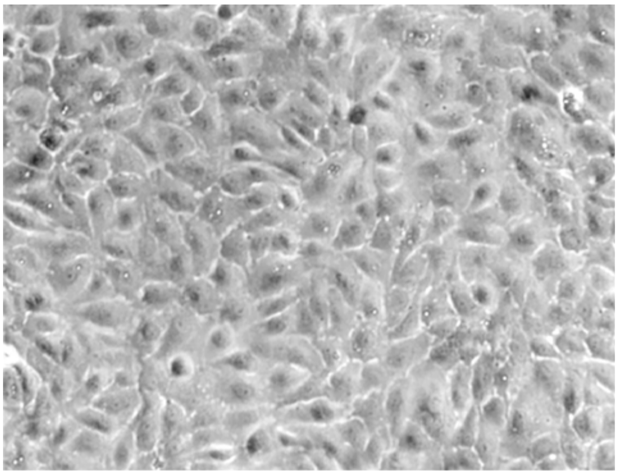
به نظر می رسد سلول های عصبی از لحاظ انتخاب بستر نسبت به اغلب سلول های دیگر مشکل پسندتر می باشند. آنها بر روی پلاستیک یا شیشه تیمار نشده به خوبی زنده نمی مانند، اما بر روی کلاژن و پلی D – لیزین رشد می کنند. برون رشد نرونی (neurite outgrowth) توسط یک فاکتور رشد عصبی پلی پپتیدی (Nerve Growth Factor: NGF) و فاکتورهای ترشح شده از سلول های گلیال که از لحاظ خصوصیات ایمنی شناسی از NGF متفاوت می باشند، افزایش می یابد. در کشت اغلب نرون ها حتی سلول هایی که در مراحل جنینی هستند و در آنها میتوز در *in vivo* آشکار بوده است، تکثیر سلولی یافت نشده است. هرچند در مطالعات اخیر با سلول ها بنیادی جنینی نشان داده است که بعضی از نرون ها را می توان وادار به تکثیر در *in vitro* و تشکیل مجدد کلنی ها در *in vivo* کرد.

سلول های گرانولی مخچه در کشت سلولهای عصبی، یک جمعیت سلولی مناسب را برای مطالعات ریخت شناسی و بیوشیمیایی فراهم می سازند. سلول ها از مخچه رت های با سن ۷ یا ۸ روز بدست آمده و با افزودن مختصر سیتوزین آرابینوزید (cytosine arabinoside) به کشت ها، از رشد سلول های غیر عصبی ممانعت می شود.

دستور کار۱۸-۱۵-سلول های گرانول مخچه ای

طرح کلی

مخچه چهار تا هشت نوزاد رت به صورت مکعب های کوچک بریده شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C در Hank's BSS تریپسینه می شود. سوسپانسیون سلولی در چاهک ها یا فلاسک های پوشش داده شده با پلی L– لیزین بذرافشانی می شود.



شکل ۲-۱۵: سلولهای اندوتلیال عروقی در کشت. نمای تک لایه سلولی اندوتلیال آئورت انسان در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی × ۱۰.

مواد

استریل:

DMEM با

a) گلوکز .... ۳۰ mM

b) L – گلوتامین .... ۲ mM

c) KCl .... ۲۴/۵ mM

d) انسولین... ۱۰۰ mU/L

e) p- آمینو بنزوئیک اسید...................................... ۷ μM

f) جنتامایسین .... ۱۰۰ μg/mL

g)FCS غیر فعال شده با حرارت.............................. ۱۰٪

Hank's BSS با ۳ g/l BSA (HBSS)

پلی L – لیزین با وزن مولکولی بیش از ۳۰۰/۰۰۰ (Sigma P-1524)

سیتوزین آرابینوزید

تریپسین (نوع II) ٪۰/۰۲۵ در HBSS

سیلیکون

پتری دیش های کشت بافت ۳/۵ cm

وسایل تشریح: اسکالپل، قیچی و پنس

پی پت پاستور و پی پتهای ۱۰ mL

لوله های آزمایش ۱۲ و ۵۰ mL

غیر استریل:

حمام آب

سیلیکونه کردن پی پت های پاستور:

a) محلول Aquasil را ٪۱-۰/۱ در UPWرقیق کنید.

b) پی پت ها را در محلول فرو برده یا داخل پی پت ها را با آن بشوئید.

c) پی پت ها را به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت هوا خشکانده یا به مدت چند دقیقه در دمای ۱۰۰°C بخشکانید.

d) پی پت ها را با حرارت خشک استریل کنید.

تیمار دیش های کشت با پلی L- لیزین:

a) پلی L- لیزین را در UPW (۱۰ mg/L) حل کنید.

b) مخلوط را با فیلتراسیون استریل کنید.

c) ۱ mL از محلول پلی L- لیزین را به هر یک از پتری دیش های ۳/۵ cm اضافه کنید.

d) محلول پلی L- لیزین را بعد از ۱۵-۱۰ دقیقه خارج کرده و ۱۵-۱ mL محیط کشت اضافه کنید.

e) دیش های کشت را در انکوباتور قرار دهید(حداقل ۲ ساعت) تا زمانی که سلول ها بذرافشانی شوند.

دستور کار

۱-مخچه را در شرایط سترون تشریح کرده وآنها را در HBSS قرار دهید.

۲-بافت را با اسکالپل به مکعب ها کوچک حدود ۰/۵ mm^3 خرد کنید.

۳-بافت خرد شده را به لوله های آزمایش (۱۲mL) انتقال داده و بافت را سه بار درHBSS شستشو دهید. اجازه دهید که بین هر شستشو بافت در ته لوله ته نشین شود.

۴-۱۰ mL تریپسین ٪ ۰/۰۲۵ (در HBSS) به بافت اضافه کرده و لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در یک حمام آب ۳۷ °C انکوبه کنید.

۵-بافت تریپسینه شده را به یک لوله سانتریفوژ ۵۰ mL انتقال داده و ۲۰ mL محیط کشت رشد اضافه کرده تا فعالیت تریپسین متوقف شود.

۶-بافت را با سایدن توسط یک پی پت پاستور سیلیکونه شده از هم جدا کرده تا زمانی که یک سوسپانسیون تک سلولی به دست آید.

۷-اجازه دهید که سوسپانسیون سلولی به مدت ۵-۳ دقیقه در لوله سانتریفوژ باقی مانده و توده های کوچک بافت در ته لوله ته نشین شوند. این توده ها را با یک پی پت پاستور خارج کنید.

۸-سوسپانسیون تک سلولی را به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰ g سانتریفوژ کرده و سوپرناتانت را خارج کنید.

۹-رسوب را مجدداً در محیط کشت رشد به حالت تعلیق در آورده و سلول ها را با غلظت $۱۰^۶$×۳-۲/۵ سلول در هر دیش بذرافشانی کنید.

۱۰-بعد از ۴-۲ روز(معمولاً بهترین نتایج بعد از ۲ روز بدست می آیند)، کشت ها را به مدت ۲۴ ساعت با سیتوزین آرابینوزید انکوبه کنید.

۱۱- آن را با محیط کشت معمول عوض کنید.

تعیین هویت کشت های نرونی: نرونها را می توان از لحاظ ایمنی شناسی با استفاده از آنتی بادی های انولاز اختصاصی نرون یا با استفاده از سم کزاز به عنوان یک نشانگر نرونی، شناسایی کرد. میزان آلودگی آستروسیتی را می توان با استفاده از پروتئین اسیدی رشته ای گلیال بعنوان نشانگر تعیین کرد.

تغییرات: یک سوسپانسیون تک سلولی را می توان توسط غربال کردن مکانیکی با استفاده از توری های نایلونی یا با تریپسینه کردن متوالی (یعنی یک تیمار تریپسین ۵-۳ دقیقه ای) یک سوسپانسیون تک سلولی بدست آورد.

سلول های گلیال (glial cells)

سلول های گلیال مغز ماکیان، جوندگان و انسان کشت داده شده است. رده های آستروگلیال (astroglial) طبیعی بالغ انسانی از رده های مغزی، پروتئین اسیدی رشته ای گلیال (Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP)، γ- آمینوبوتیریک اسید با میل ترکیبی بالا و جذب گلوتامات و

فعالیت گلوتامین سنتتازی را بیان می کنند. الیگودندروسیت ها به آسانی در واکشت زنده نمی مانند اما سلول های پیش ساز الیگودندروسیت عصب بینایی با استفاده از PDGF و FGF2 بعنوان میتوژن، کشت داده شده اند. سلول های شوان با استفاده از سم کلرا بعنوان میتوژن کشت داده شده اند اما امروزه رشد بهینه با اضافه کردن فاکتور رشد گلیال و forskolin در محیط کشت حاوی ٪ ۱۰ سرم حاصل می شود. سلول های گلیال کشت داده شده در ترمیم با واسطه ترانسپلنت آسیب های نخاعی موفقیت هایی را به همراه داشته است.

توانایی برای تولید جمعیت های بسیار غنی شده از انواع سلولی خاص، برای موفقیت مطالعات زیست شناسی بر روی عناصر متنوعی که رشد، تمایز و عملکرد سلول را کنترل می کند، حیاتی می باشد. در این خصوص جداساز سلولی فعال شونده با فلورسنس (FACS) یک ابزار قدرتمند برای غنی سازی جمعیت های نسبتاً کم سلولی از یک جمعیت سلولی ناهمگون می باشد. در ابتدا دستگاه جداساز سلولی برای توصیف و مرتب کردن سلول های سیستم خونساز اختراع شد که در آن تعداد زیادی از آنتی بادی های اختصاصی سلول موجود می باشد. به دلیل در دسترس بودن آنتی بادی هایی که هم نرونها و هم گلیا را مشخص می کند، اکنون انتقال این تکنیک به حوزه زیست شناسی نرون (neurobioligy) امکان پذیر شده است.

پیاز بویایی در بین بافت های عصبی به شدت مورد توجه می باشد زیرا تنها سیستم عصبی مرکزی بافت پستانداران می باشد که می تواند بازسازی(regeneration) نرونی را در تمام طول زندگی حمایت کند. به محض این که مرگ نرونی اتفاق می افتد، خواه در طی دوره بازگردش سلولی طبیعی یا بعد از آسیب، نرون های تازه تولید شده از یک مخزن از سلول های بنیادی که دائماً در حال تکثیر می باشند، تقویت می شوند. این نرون ها قادر به تولید اکسون هایی می باشند که دوباره پیاز بویایی را ساخته و مجدداً حس بویایی را برقرار می کند. به نظر می رسد که جمعیت سلولی گلیال موجود در لایه عصب بویایی پیاز بویایی که به نام سلول های پوشاننده پیاز بویایی (Olfactory Ensheathing Cells: OECs) نامیده می شوند رشد آکسونهای بویایی را در CNS حمایت یا تشویق می کنند . در واقع مطالعات اخیر نشان داده است که OECها قادر به میلین دار کردن مجدد آسیب های بدون میلین شده که در شرایط آزمایشگاهی در طناب نخاعی رت بوجود آمده و حمایت از اکسون قطع شده می باشد.

برای مطالعه مفصل زیست شناسی OECها، لازم است که آنها را از انواع سلول های عمده که پیاز بویایی را می سازند شامل: نرونها، سلول های گلیال CNS، الیگو دندروسیت ها و آستروسیت ها، سلول های اندوتلیال و سلول های منتژیال(meningeal cells) جداسازی کرد.

پیاز بویایی رت معیارهای جداسازی سلولی موفق توسط FACS را تأمین می کند، از این حیث که:

۱-به آسانی پس از تیمار آنزیمی یک سوسپانسیون تک سلولی تشکیل می دهد و

۲-آنتی بادی تک دودمانی موشی O4 به همراه آنتی بادی آنتی گالا کتوسربروزید (anti-GalC) می تواند برای تشخیص OESs از انواع سلول های موجود دیگر استفاده شود. آنتی بادی O4 سولفاتید، seminolipid و آنتی ژن پرولیگو دندروبلاست را تشخیص داده و بسیاری از سلول های گلیال CNS و PNS شامل سلول های شوان ، الیگودندروسیت ها و سلول های پیش ساز و آستروسیت نوع ۲ الیگودندروسیتی (O-2A) را نشان دار می کند. پیاز بویایی شامل سه جمعیت سلولی می باشد OECs ، الیگودندروسیت ها، و پیش سازهای O-2A که به وسیله آنتی بادی O4 نشان دار می شوند. همچنین بر خلاف OECs ، پیش سازهای الیگودندروسیت ها و O-2A توسط آنتی بادی ضد GaLC نشان دار شده که می تواند به عنوان یک نشانگر گزینش منفی استفاده شود. با استفاده توأم از این دو نوع آنتی بادی، مشاهده شده که ٪۱۴-۸ از سلول های O4 مثبت ، OECs بوده و کمتر از ٪۱ کل سلول های O4 مثبت، الیگودندروسیت ها یا پیش سازهای O-2A می باشند. OECs خالص شده با FAC که O4 مثبت می باشند را می توان به دو نوع سلول شبیه سلول های شوان و شبیه آستروسیت تقسیم کرد که توسط یک دسته از نشانگرهای نرونی، قابل تشخیص می باشند. این دو نوع سلول ممکن است در *in vivo* وظایف عملکردی مختلفی داشته باشند. فاکتور رشدی که رشد و تمایز آنها را تنظیم می کند اخیراً بررسی شده است. در حضور محیط کشت شرطی آستروسیت نوع I (ACM) ، OEC ها حداقل به مدت ۱۴ روز زیستایی و رشد خوبی را نشان می دهند.

دستور کار زیر یک روش سریع را برای خالص سازی جمعیت مختصر سلول های گلیال از پیاز بویایی با استفاده از یک آنتی بادی سطح سلولی و FACS شرح می دهد. هرچند این اصول را می توان برای خالص سازی هر نوع جمعیت نرونی یا گلیال به کار برد مشروط بر این که دو معیار اصلی تأمین شود: محقق قادر به تولید یک سوسپانسیون تک سلولی زنده بوده و آنتی بادی های مناسب اختصاصی سلولی برای تشخیص سلول های مورد نظر وجود داشته باشد.

دستور کار۱۹-۱۵- سلول های پوشاننده پیاز بویایی

مواد

جدول ۱-۱۵: تعیین هویت سلولهای گلیال توسط immunostaining

Cell type	GFAP	Gal-C	O4	A2B5	NGF
O2-A	−	−	−	+	−
Type-1 astrocyte	+	−	−	−	−
Type-2 astrocyte	+	−	−	+	−
Oligodendrocyte	−	+	+[a]	+[a]	−
ONEC	+/−[c]	−	+[b]	−	+

[a]Mature oligodendrocytes lose A2B5 and become GalC$^+$ and O4$^+$ only.
[b]ONECs lose O4 in culture.
[c]GFAP may be fibrous or amorphous. ONECs gain GFAP expression in culture.

استریل یا تهیه شده در شرایط آسپتیک:

استوک پلی L- لیزین ۴ mg/mL که به نسبت ۱:۳۰۰ در UPW استریل رقیق شده باشد وبا غلظت نهایی ۱۳/۳ µg/mL استفاده می شود

استوک کلاژناز نوع I، ۲۰۰۰ U/mL در L-15 Hank's BSS فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+}

محیط کشت Leibowitz L-15 به اضافه ۲۵ µg/mL جنتامایسین

DMEM/FBS: (DMEM با ۵٪ FBS)

محیط کشت DMEM/BS حاوی:

a) گلوکز (۴/۵ g/L)........................ ۲۵ mM
b) جنتامایسین.......................... ۲۵ µg/mL
c) BSA Pathocyte.............. (v/v) ٪ ۰/۰۲۸۶
d) گلوتامین.............................. ۲ mM
e) انسولین پانکراس گاو................ ۱۰ µg/mL
f) ترانسفرین انسان..................... ۱۰۰ µg/mL
g) پروژسترون............................ ۰/۲ µM
h) پوترسین.......................... ۰/۱ µM
i) L- تیروکسین......................... ۰/۴۵ µM
j) سلنیوم.............................. ۰/۲۲۴ µM
k) ۳و'۳و ۵- تری یدو-L- تیرونین.......... ۰/۴۹ µM

آنتی بادی های تک دودمانی: O4: MAB345

آنتی گالاکتوسروبروزید: MAB342

آنتی بادی های ثانویه: فلورسین- IgM ضد موشی و فیکواریترین - IgG3 ضد موشی

فلاسک، دیش و لامل؛ تمام پلاستیک های کشت بافت و لامل های شیشه ای را با ۱۳/۳ mg/mL پلی L- لیزین بپوشانید:

a) به مدت حداقل ۱ ساعت و حداکثر ۲۴ ساعت انکوبه کنید
b) پلاستیک ها و لامل ها را یکبار با D-PBSA شستشو دهید
c) قبل از استفاده آنهارا در مجاورت هوا خشک کنید

پتری دیش

فالکون مخروطی پلی پروپیلنی ۱۵mL درب دار

پنس، خمیده و راست(سایز ۷)

لوله پلی استیرن ۷۵ mm × ۱۲ ته گرد درب دار

قیچی خمیده برای تشریح

اسکالپل

غیر استریل:

رت های Sprague-Dawley ۸-۶ روزه post partom.

از رت های نوزاد در مقایسه با حیوانات مسن تر مقدار بیشتری OECs بدست می آید، هرچند امکان تهیه نمونه از حیوانات با هر سنی وجود دارد.

تخته و سنجاق تشریح

الکل٪۷۰ در بطری اسپری

جورساز سلولی فعال شونده با فلورسانس (Fluorescence Activated Cell Sorter: FACS)

دستور کار:

تهیه سوسپانسیون سلولی تفکیک شده از OECs :

۱-رت ها را سر ببرید. از ۲۰-۱۵ رت برای هر بار کار با دستگاه FACS و برای بازیافت میزان کافی از OECها برای ۱۵-۱۰ لامل (۱۰۰۰۰ سلول در هر لامل) استفاده کنید.

۲-سر را به گونه ای که سطح پشتی آن به سمت بالا باشد بر روی تخته تشریح سنجاق کرده و با الکل ٪۷۰ اسپری کنید.

۳-تمام وسایل تشریح را قبل از استفاده در الکل ٪۷۰ فرو برده و تکان دهید تا خشک شود.

۴-پوست سر را با استفاده از قیچی خمیده تیز برداشته و یک برش گرد برای برداشتن قسمت بالای جمجمه برای آشکار کردن مغز و دو پیاز بویایی در نوک بینی ایجاد کنید.

۵-با استفاده از پنس های خمیده با ملایمت پیاز بویایی مغز را آزاد کرده و آنها را در یک پتری دیش حاوی یک قطره L-15 به اضافه جنتامایسین قرار دهید.

۶-با استفاده از یک تیغه اسکالپل استریل، پیازهای بویایی را به قطعات کوچک ببرید.

۷-قطعات را در یک ویال کوچک حاوی ۱mL استوک کلاژناز و ۱mL L-15 قرار دهید.

۸-قطعات پیازهای بویایی را در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه انکوبه کنید.

۹-سوسپانسیون به دست آمده را به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ کرده و سوپرناتانت را خارج کنید.

۱۰-بافت پیاز رسوب یافته را مجدداً در ۱ mL HBSS فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+} به حالت تعلیق درآورید.

۱۱-سلول های گلیال شکننده می باشند، بنابراین برای تولید سوسپانسیون تک سلولی باید بافت پیاز بویایی به آرامی جداسازی شده و مراقب باشید که حباب های هوا تولید

نشود. بافت را با استفاده از یک سوزن تزریق زیر پوستی ۱۹G و پس از آن با سوزن تزریق زیر پوستی G ۲۳ جداسازی کنید.

۱۲- mL ۵ از HBSS فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+} اضافه کرده و دوباره سوسپانسیون را به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفوژ کنید سوپرناتانت را خارج کرده و مجدداً سلول ها را با غلظت ۵×۱۰^۶ سلول/ میلی لیتر در DMEM-FCS به حالت تعلیق درآورید.

مرتب نمودن OECها با استفاده از FACS: (FACS sorting of OBECs)

به منظور برطرف کردن حداکثر الیگودندروسیت های $O4^+$ از جمعیت سلولی، ترجیح داده می شود که آنها را با یک آنتی بادی ثانوی ضد گالاکتوسربروزید (anti-GalC) نشاندار کرد. بنابراین افتراق بین الیگودندروسیت ها و OECها را امکان پذیر می سازد. در این روش، یک مرتب نمودن دو رنگی (dual-color sort) را می توان انجام داد که در آن می توان از سلول های ناخواسته که با هر دو آنتی بادی نشان دار شده اند چشم پوشی کرد.

۱۳-بعد از جداسازی بافت، ۵×۱۰^۶ سلول را مجدداً در µL ۵۰۰ از مخلوط سوپرناتانت های هیبریدوما آنتی بادی O4 و ضد GalC به حالت تعلیق درآورید و در یک لوله سانتریفوژ ۱۵mL به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در دمای °C ۴ انکوبه کنید. بیش از ۵×۱۰^۶ سلول وجود خواهد داشت، بنابراین تعداد کافی لوله برای این تعداد سلول آماده کنید. اگر سوپرناتانت هیبریدوما حاوی غلظت های بالایی از آنتی بادی نباشد باعث افزایش درتعداد سلول ها و کاهش آشکار در درصد سلول های $O4^+$ خواهد شد. یک توجه مشابهی نیز برای سوپرناتانت هیبریدوما ضدGalC به کار می رود. بنابراین همیشه لازم است تا آنتی بادی ها را قبل از استفاده با FACS تجزیه و تحلیل کرد.

۱۴-بعد از۴۵-۳۰ دقیقه، سلول ها را دو بار در DMEM-FCS شستشو داده و مجدداً در µL ۵۰۰ از DMEM-FCS دارای رقت ۱۰۰ : ۱ از هم IgM – فلورسین ضد موشی بز و هم فیکواریترین – IgG3 ضد موشی بز به حالت تعلیق درآورید. سلول ها را به مدت ۳۰ دقیقه دیگر در دمای °C ۴ انکوبه کنید.

۱۵-سلول ها را دو بار با سانتریفوژ کردن در mL ۱۵ از DMEM-FCS شستشو داده و مجدداً آنها را با غلظت ۲×۱۰^۶ سلول/ میلی لیتر برای مرتب نمودن در محیط کشت های DMEM-FCS سرد شده در یخ در لوله های مرتب نمودن سلولی (cell sorting tubes) به حالت تعلیق درآورید. سوسپانسیون سلولی را بر روی یخ نگهداری کنید. زمانی که سلولها بر روی یخ نگهداری می شوند خصوصیات FACS برای سلول های نشاندار شده با آنتی بادی حداقل به مدت ۴-۳ ساعت پایدار است.

۱۶-این دستور کار روش مورد استفاده برای مرتب کردن سلول ها توسط یک جورساز سلولی FACStar را شرح داده است. هر چند در هر نوع جورساز سلولی باید نتایج مشابه حاصل شود. لیزر را در لاین تهییج nm ۴۸۸ تنظیم کنید. تصحیح فلورسانس باید برای خنثی کردن اثرات فلورسانس در داخل کانال های فلورسنت اختصاصی تنظیم شود. یک نمونه شاهد از سلول هایی که فقط با آنتی بادی های ثانوی نشاندار شده است باید قبل از نمونه نشاندار شده تجزیه و تحلیل شود به طوریکه هر گونه نشان سلولی غیر اختصاصی را بتوان گزارش کرده و با کاهش دادن gain روی لوله دستگاه تقویت کننده نوری بتوان آنها را برطرف کرد.

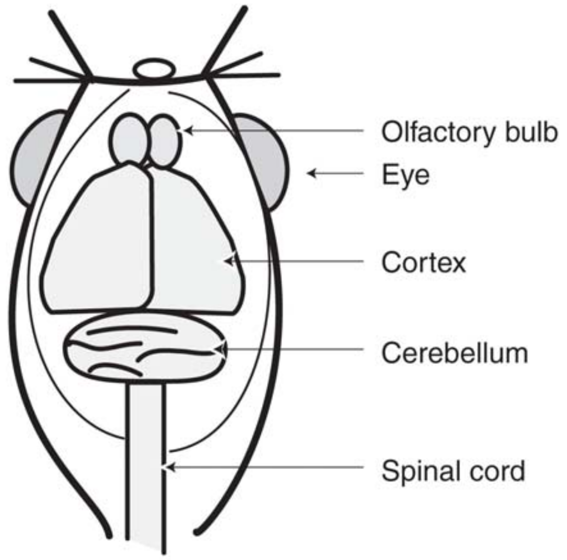
۱۷-یک دریچه مرتب کردن سلولی را در اطراف سلول های $O4^+$ $GaLC^-$ تنظیم کنید . درصد متوسط سلول های بویایی $O4^+$ باید در حدود ٪۱ ± ۱۰ باشد.

۱۸-سلول های $O4^+$ $GaLC^-$ را در یک لوله ته گرد پلی استیرنی حاوی ۴mL از DMEM/FBS مرتب کنید.

۱۹-بعد از مرتب نمودن، سلول های مرتب شده را به یک لوله سانتریفوژ ۱۵mL انتقال داده، لوله مرتب کردن را با محیط کشت شستشو داده، سلول های شستشو داده شده را مخلوط کرده و لوله سانتریفوژ را با DMEM/FBS پر کنید. لوله سانتریفوژ را به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفوژ کنید.

۲۰-سوپرناتانت را خارج کرده و مجدداً سلول ها را در DMEM/BS به حالت تعلیق درآورید. ممکن است زیستایی سلول و رشد بهینه برای OBECs در رقت ۱:۱ از ACM : DMEM/BS بدست آید. ACM از تک لایه های آستروسیت قشری خالص سازی شده، جمع آوری شده و به مدت ۴۸ ساعت در DMEM/BS انکوبه می شود. همچنین سلول ها را می توان در (۵ : ۱) ACM ، FGF2 (۱۰ ng/mL) ، forskolin (۱۰ µM) رقیق شده در DMEM/BS که سپس با نسبت ۱:۱ در DMEM حاوی ٪ ۱۰ FBS رقیق می شود، کشت داد.

این دستور کار یک جمعیت بسیار غنی شده از سلول های گلیال پیاز بویایی $O4^+$ تولید می کند(٪۹۷ <) . ممکن است



شکل ۳-۱۵: تشریح پیاز بویایی. شکل شماتیک جدا سازی پیازهای بویایی از مغز رت های نوزاد.

این سلول ها بر روی فلاسک ها، دیش ها یا لامل های پوشیده شده با پلی L- لیزین کشت داده شده و برای بررسی بیشتر استفاده شوند. شواهد اخیر نشان می دهد که این سلول ها با سلول های OECs که در مطالعه میکروسکوپ الکترونی شرح داده شده اند مطابق بوده و تحقیق در مورد خصوصیات بیشتر آنها در حال انجام است.

سلول های غدد درون ریز

کشت دادن سلول های غدد درون ریز مشکل می باشد زیرا ممکن است تعداد نسبی سلول های ترشحی کاملاً کم باشد. Sato و همکارانش سلول های عملکردی غدد فوق کلیه و غده هیپوفیز تومورهای رت را با جداسازی مکانیکی تومور و کشت تک لایه معمولی کشت داده اند. تمامیت عملکردی سلول ها با پاساژ متناوب سلول ها به صورت تومور، در رت حفظ شد. اکنون این رده ها کاملاً نسبت به کشت سازگار شده اند و می توان آنها را بدون پاساژ حیوانی و در بعضی موارد در محیط های کشت کاملاً تعریف شده نگهداری کرد.

فیبروبلاست ها در کشت های سلول های جزیره ای (islet cells) پانکراسی یا تیمار توسط اتیل مرکوری تیوسالیسیلات کاهش یافته و همچنین توسط سانتریفوژ شیب چگالی و توسط آب شویی سانتریفوژی، خالص سازی شده اند. سلول های جزیره ای ظاهراً اما نه همانند رده های سلولی تکثیر یافته، انسولین تولید می کنند. همچنین کشت های کوتاه مدت از سلول های پیش ساز مجرایی (ductal) که در محیط کشت بدون سرم قادر به تمایز به سمت سلول های ترشح کننده انسولین می باشند، تولید شده اند.

سلول های غده هیپوفیز که برای چندین واکشت تولید هورمون های هیپوفیزی می کنند از موش جداسازی شده اند. هر چند سلولهای غده هیپوفیز انسان نرمال به خوبی زنده نمی مانند و سلول های آدنومای هیپوفیز به تدریج ظرفیت ساخت هورمون ها از دست می دهند، کشتهای سه بعدی از آدنوماهای هیپوفیز به ترشح پرولاکتین ادامه می دهند.

ملانوسیت ها

از وابستگی زیاد کراتینوسیت های کشت یافته نسبت به بستر برای دستیابی به چسبیدن و رشد ترجیحی ملانوسیتها و رشد در یک محیط کشت تکمیل شده با هورمون استفاده شده است. این سیستم بر مشکل آلودگی کراتینوسیت ها غلبه کرده و با حداقل تکمیل سرم در غیاب عوامل شیمی درمانی یا پروموتورهای سرطانی از قبیل استرهای فوربول (phorbol esters) باعث تکثیر زیاد ملانوسیت می شود. این مواد پروتئین کیناز C(PKC) و بنابراین فعالیت تیروزیناز را مهار کرده و تولید رنگدانه را متوقف می کند. با تکمیل با سرم متداول (۲۰-۵٪) رشد ملانوسیت به مراتب بهتر از سیستم های دیگر می باشد و می توان با کاهش غلظت Ca^{2+} به ۰/۰۳ mM از رشد بیش از حد فیبروبلاست جلوگیری کرد. سیستمی که در این جا شرح داه می شود را می توان با حذف کردن سم کلرا (که رشد ملانوسیت را با افزایش زیاد سطح cAMP داخل سلولی افزایش می دهد) و جایگزین کردن دی بوتیریل cAMP (dibutyryl cAMP) تعدیل کرد. این محیط کشت سطوح فیزیولوژیک PKC و cAMP را فراهم ساخته که مطالعه عوامل تنظیم کننده cAMP را تحت شرایطی که برای بررسی ها بهینه می باشد امکان پذیر می سازد.

دستور کار ۲۰-۱۵- ملانوسیت ها

طرح کلی

اپیدرم بعد از تریپسینه کردن قطعات کوچک پوست، جدا شده و سلول ها در EDTA جداسازی شده و در محیط کشت تکمیل شده با basic FGF (FGF-2) کشت می شوند.

مواد

استریل:

D-PBSA
FBS

محیط کشت ملانوسیت تکمیل شده با هورمون (MHSM):

a) محیط کشت ۱۹۹ (Gibco ۴۰۰-۱۲۰۰)، ۹۳/۱mL

b) EGF (استوک ۱۰ µg/mL)، ۰/۱ mL با غلظت نهایی ۱۰ ng/mL

c) ترانسفرین (استوک ۱۰ mg/mL)، ۰/۱ mL با غلظت نهایی ۱۰ µg/mL

d) انسولین (استوک ۱۰ mg/mL)، ۰/۱ mL با غلظت نهایی ۱۰ µg/mL

e) تری یدوتیرونین (استوک ۱ µM)، ۰/۱ mL با غلظت نهایی ۱ nM

f) هیدروکورتیزون (استوک ۰/۲۸ mM)، ۰/۵ mL با غلظت نهایی ۱/۴ µM

g) سم کلرا (استوک ۰/۱ µM)، ۱ mL با غلظت نهایی ۱ nM

به جای سم کلرا می توان از عصاره غده هیپوفیز گاو ۳۵ µg/mL ؛ استوک نهایی ۰/۷ ng/mL و دی بوتیریل cAMP ، استوک ۱ mM و در نهایت ۱۰۰ µM استفاده کرد.

h) basic FGF (استوک ۲۰۰ ng/mL)، ۵ mL با غلظت نهایی ۱۰ ng/mL

تریپسین / EDTA : تریپسین ۰/۲۵٪ در D-PBSA با ۰/۱٪ EDTA (۳/۵ mM)

بازدارنده تریپسین سویا ۱۰ µg/mL

دیش های کشت بافت با قطر ۱۰، ۶ و ۳/۵ cm

پی پت

لوله های سانتریفوژ ۱۵ و ۵۰ mL

غیر استریل:

انکوباتور مرطوب(۳۷ °C و ۷٪ CO_2)

حمام آب

سلول شمار الکترونیکی یا هموسیتومتر

دستور کار

تهیه کشت اولیه

روز ۱:

۱-نمونه پوست را با اتانول ۷۰٪ و سپس دو بار با D-PBSA شستشو دهید.

۲-بافت را به یک دیش ۱۰ cm استریل انتقال داده به صورتی که سطح اپیدرمی به سمت پایین قرار گیرد.

۳-با قیچی تشریح، چربی زیر پوستی و پوست عمقی (deep dermis) را برش دهید.

۴-بافت باقیمانده را با اسکالپل به تکه های ۲×۲ mm برش دهید. تیغه را روی بافت گذاشته و ببرید (از حرکت اره کردن استفاده نکنید.)

۵-قطعات بافت را به تریپسین ۰/۲۵٪ سرد در یک لوله سانتریفوژ ۱۵ mL انتقال دهید.

۶-قطعات بافت را به مدت ۱/۵-۱ ساعت در درجه حرارت اتاق انکوبه کنید. برای بعضی از نمونه ها انکوباسیون در دمای ۴°C به مدت ۲۴-۱۸ ساعت، ممکن است محصول ملانوسیت بیشتری تولید کند.

روز ۲:

۷-با ملایمت به لوله سانتریفوژ ضربه وارد کرده تا قطعاتی که در ته لوله ته نشین شده اند جدا شوند و سپس سریعاً محتویات لوله را به یک دیش ۶ cm خالی کنید.

۸-با استفاده از پنس، قطعات بافت را به صورت مجزا به یک دیش ۱۰cm به صورتی که سطح اپیدرمی به سمت پایین باشد انتقال دهید. به آرامی هر یک از قطعات بافت را در دیش بگذارید. صفحه اپیدرمی باید به دیش چسبده و امکان جداسازی تمیز لایه درم را با پنس بدهد. قطعات درم را دور بریزید.

۹-تمام صفحات اپیدرمی را با یک لوله سانتریفوژ ۱۵ mL استریل حاوی ۵ mL از EDTA ۰/۰۲٪ (۰/۷ mM) انتقال دهید. توجه کنید که هر کدام از صفحات اپیدرمی را در محلول EDTA قرار دهید و بر روی دیواره پلاستیکی لوله سانتریفوژ نگذارید.

۱۰-لوله را به آرامی ورتکس کرده تا صفحات اپیدرمی به صورت سوسپانسیون تک سلولی تبدیل شود.

۱۱-سلول ها را به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰ g سانتریفوژ کرده و سپس سوپرناتانت را خالی کنید.

۱۲-رسوب سلولی را مجدداً در محیط کشت ملانوسیت فاقد سرم به حالت تعلیق درآورید.

۱۳-سلول ها را با یک هموسیتومتر شمارش کرده و 1×10^6 سلول(تقریباً $2-4 \times 10^4$ ملانوسیت) را در هر دیش ۳/۵ cm در ۲ mL محیط کشت تکمیل شده با هورمون و دارای ۵٪ FBS تلقیح کرده تا اتصال سلول ها تسهیل شود.

۱۴-هفته ای دو مرتبه کشت را با محیط کشت فاقد سرم تازه حاوی فاکتورهای رشد و عصاره هیپوفیز گاوی غذا دهی کنید.

روز ۳۰-۳ :

۱۵-در ساعت ۲۴ ام، کشت، حاوی کراتینوسیت های اولیه با ملانوسیت های پراکنده شده می باشد. تکثیر کراتینوسیت باید در طی چند روز متوقف شده و باید کلنی ها در طی هفته دوم شروع به جدا شدن کنند. تا پایان هفته سوم، فقط ملانوسیت ها باید باقی بمانند. در اغلب موارد کشت ها نزدیک به حالت تراکم رسیده و در هفته های ۴-۲ برای پاسخ دادن آماده می باشند.

واکشت:

۱۶-به آرامی دیش کشت را دوبار با EDTA ۰/۰۲٪ (۰/۷ mM) شستشو دهید.

۱۷-۳ mL تریپسین ۰/۲۵٪ / EDTA ۰/۱٪ (۲/۵ mM) اضافه کرده و در دمای ۳۷ °C انکوبه کنید. دیش را هر ۵ دقیقه یک بار زیر میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی کرده تا جداشدن سلول ها را مشخص کنید.

۱۸-وقتی که اغلب سلول ها جدا شدند، تریپسین را با بازدارنده تریپسین سویا (۱۰ µg/mL) یا ۱ mL محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم گوساله غیر فعال کنید.

۱۹-محتویات دیش را پی پت کرده تا از جداسازی کامل ملانوسیت ها مطمئن شوید.

۲۰-سلول ها را به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰ g سانتریفوژ کنید.

۲۱-سوپرناتانت را خالی کرده، سلول ها را مجدداً در یک محیط کشت ملانوسیت فاقد کلسیم حاوی ۵٪ FBS بدون کلسیم به حالت تعلیق در آورده و مجدداً با غلظت ۲-۴×۱۰^{۴} سلول در هر دیش ۱۰ cm کشت دهید. FBS برای چسبیدن خوب ملانوسیت ها (< ۷۵٪) به دیش های پلاستیکی مورد نیاز است اما اگر دیش ها با فیبرونکتین یا کلاژن نوع I/II پوشش داده شوند می توان آن را حذف کرد.

۲۲-هفته ای دو بار کشت را با محیط کشت ملانوسیت بدون سرم یا سرم دار غذادهی کنید. محیط کشت دارای سرم محصول ملانوسیت بیشتری تولید می کند اما رشد فیبروبلاست ها را تحریک می کند. کاهش دادن غلظت کلسیم تا ۰/۰۳ mM هیچ گونه تأثیری بر روی تکثیر ملانوسیت ها ندارد اما رشد بیش از حد فیبروبلاست ها را باز می دارد.

تأیید هویت ملانوسیتی

کشت های ملانوسیت ممکن است در ابتدا با کراتینوسیت ها و در هر یک از مراحل با فیبروبلاست های پوستی آلوده شوند. هر دو نوع آلودگی در کشت هایی که توسط افراد با تجربه ایجاد و نگهداری می شوند، نادر می باشد اما برای افراد مبتدی متداول می باشد. با بررسی کشت زیر میکروسکوپ فاز کنتراست با فرض این که فرد مشاهده کننده با شکل سلول ها آشنا باشد، می توان با اطمینان نسبی سلول های ملانوسیت را تأیید کرد. شناسایی دقیق تر را میتوان با بررسی میکروسکوپ الکترونی، رنگ آمیزی DOPA یا رنگ آمیزی ایمنوفلورسنت با آنتی بادی Mel 5 بر ضد پروتئین -۱ وابسته به تیروزیناز انجام داد.

سلول های خونساز (hematopoietic cells)

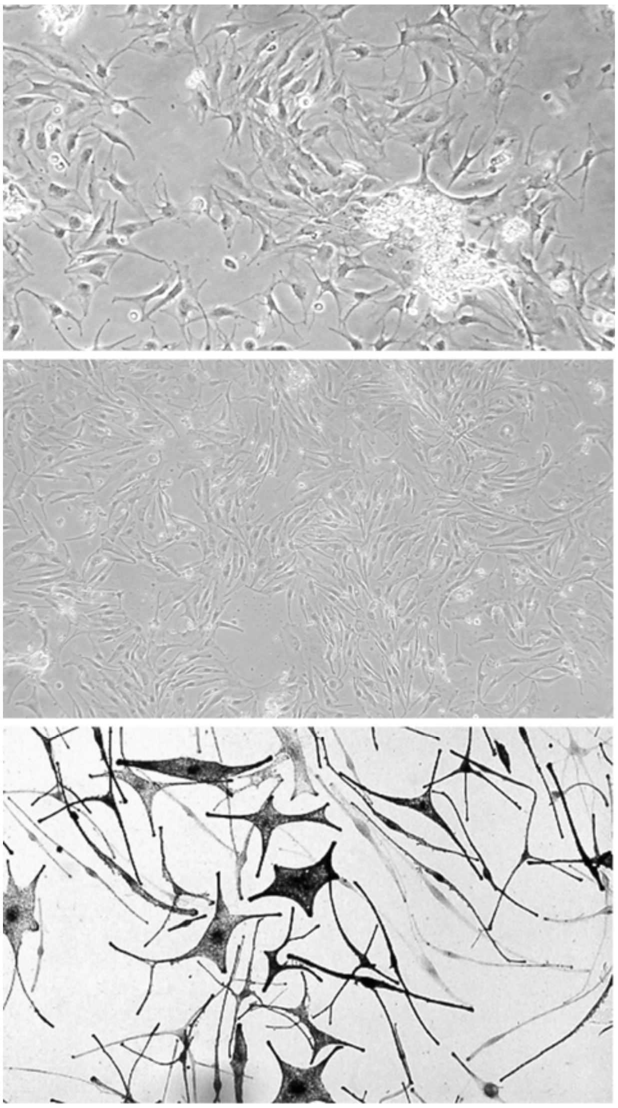
سلول های خونساز در آزمون ها تشکیل دهنده کلنی(colony forming assays)، در کشت های طولانی مدت مغز استخوان و به صورت رده های سلولی پیوسته رشد داده شده اند. با کنترل فاکتورهای رشد اختصاصی می توان سلول های بنیادی خونساز یا CFU-A را از کشت های آگار مجدداً کلون کرد. به نظر می رسد MIP -1α فاکتور اصلی بوده که سلول های بنیادی را در حالت زایا نگه می دارد. هرچند اغلب کلنی های سوسپانسیون که فقط حاوی سلول های یک دودمان می باشند، فقط به صورت کشت های اولیه که کارایی ایجاد جمعیت مجدد خود را از دست داده، زنده می مانند و بنابراین نمی توان آنها را واکشت داد. کلنی ها گرانولوسیتی متداولترین دودمان ها بوده اما تحت شرایط مناسب دودمان های دیگر را هم می توان تولید کرد.

تعدادی از رده های سلولی میلوئید از لوکمیاهای موشی بوجود آمده است و شبیه تعدادی از رده های لنفوبلاستوئید انسانی، نشان داده شده است که زنجیره گلوبولین و در بعضی موارد گلوبولینهای α و γ کامل را می سازند. بعضی از این رده ها را می توان در محیط کشت فاقد سرم رشد داد. رده های سلولی T به فاکتورهای رشد سلول T (مثل اینترلوکین ۲) نیاز دارند .

اولین رده سلولی لنفوبلاستوئید انسانی با کشت لنفوسیت های محیطی خون با دانسیته های سلولی بسیار بالا (~ ۱۰^{۶}/ mL) معمولاً در کشت های عمیق (< ۱۰ mm) بوجود آمد. بعداً مشخص شد که جاودان سازی بواسطه EBV بوده و اکنون تکنیکهای مناسب برای این روش در دسترس می باشد.

Friend و Rossi نشان داده اند که یک ویروس RNA دار موشی(ویروس Friend) می تواند باعث اسپلنومگالی(splenomegaly) و اریتروبلاستوزیس (erythroblastosis) در موش های آلوده شود. کشت های سلولی که از طحال های خرد شده این حیوانات بدست می آید، در بعضی موارد منجر به تولید رده های سلولی پیوسته از سلول های اریترولوکمیا می شود. همه این رده ها توسط چیزی که اکنون به عنوان یک کمپلکس از ویروس های ناقص و یاری دهنده منشأ گرفته از ویروس سارکوما Moloney می باشد، ترانسفورم شده اند. بعضی از رده های سلولی قادر به تولید ویروسی می باشند که در *in vivo* آلوده کننده بوده اما در *in vitro* آلوده کننده نمی باشد و همچنین سلول ها را می توان به صورت تومورهای توپر یا تومورهای آسیت (ascites) در موش های DBA2 یا BALB-c پاسخ داد.

تیمار کشت های سلول های Friend با تعدادی از عوامل شامل DMSO ، پیروات سدیم، ایزوبوتیریک اسید و هگزا متیلن بیس استامید، تمایز اریترونید را افزایش می دهد. سلول های تیمار نشده شبیه پرواریتروبلاست های تمایز نیافته بوده در حالی که در سلول های تیمار شده انقباض هسته، کاهش اندازه سلولی و تجمع هموگلوبین به اندازه ای که رسوبات سلولی سانتریفوژ شده، قرمز رنگ می باشند مشاهده می گردد. وجود تمایز را می توان با رنگ کردن سلول ها برای



شکل ۴-۱۵: کشت های ملانوسیت. (a)کشت ملانوسیت های حاصل از پوست ختنه گاه نوزاد، یک هفته پس از تلقیح. به کلنی های کراتینوسیت با لایه بندی مرکزی و سلولهای اپی تلیال در اطراف آنها توجه شود. ملانوسیت ها سلولهای دندریتیک تیره و نسبتاً کوچک بوده که اغلب توسط برآمدگی های دندریتیک با کلنی های کراتینوسیت در تماس می باشند (با میکروسکوپ فاز کنتراست دیده شود). (b) کشت های اولیه ده روزه ملانوسیت های اپیدرمی نوزاد در محیط کشت فاقد TPA. بسیاری از سلولها دارای دندریت های شاخه ای بوده و سلولهای دیگر دارای مورفولوژی دو قطبی یا چند وجهی می باشند (با میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگنمایی ۳۲۰ برابر دیده شود). (c) کشت ثانویه از ملانوسیت های اپیدرمی که با TPA تیمار شده اند. به مورفولوژی دندریتیک سلولها، پیگمانتاسیون و شکل دوکی و بلند و باریک آنها توجه شود.

هموگلوبین با بنزدین و دو رگه سازی *in situ* ، mRNA اختصاصی گلوبین مشخص کرد. همچنین می توان رده سلولی لوکمیک انسانی K562 را با سدیم بوتیرات و همین برای تمایز القا کرد.

ممکن است ماکروفاژها را با جمع آوری سلول هایی که در طی جداسازی آنزیمی اتصال می یابند، از بسیاری بافت ها جداسازی کرد . هرچند محصول نسبتاً اندک می باشد و تعدادی از تکنیکها برای بدست آوردن تعداد زیادتری از ماکروفاژها توسعه یافته است، ممکن است روغن معدنی یا تیوگلیکولات براث به صفاق موش تزریق شده و ۳ روز بعد مایع حاصل از شستشوی صفاق حاوی نسبت بالایی از ماکروفاژها می باشد. ممکن است در صورت نیاز ماکروفاژها را به دلیل توانایی در اتصال به بستر کشت در حضور پروتئازها خالص سازی کرد. ماکروفاژها را به دلیل حساسیت نسبت به تریپسین به سختی می توان واکشت داد. روش هایی با استفاده از پلاستیک های هیدروفوب (مثل دیش های petriperm) توسعه پیدا کرده است.

گزارش هایی در مورد رده های تکثیر یافته ماکروفاژها، غالباً از نئوپلازی موشی وجود دارد. ماکروفاژهای بالغ طبیعی تکثیر نمی شوند. هر چند ممکن است کشت سلول های پیش ساز در حال تکثیر توسط روش Dexter و Spooncer امکان پذیر باشد (دستور کار زیر).

کشت های دراز مدت مغز استخوان

با کشت دادن مغز استخوان کامل، نسبت بین سلول های بنیادی و استروما حفظ شده و در حضور برهمکنش های مناسب سلول های استروما و سلول های خونساز، سلول های بنیادی و سلول های پیش ساز خاص قادرند به مدت بیش از چندین هفته به تکثیر ادامه دهند. ممکن است سلول های پیش ساز مغز استخوان تازه یا کشت های دراز مدت توسط رشد کلونوژنیک در آگار نرم یا در موش ها سنجیده شوند.

دستور کار ۲۱-۱۵- کشت دراز مدت سلول های خونساز مغز استخوان

طرح کلی

مغز استخوان به داخل محیط کشت وارد شده و به مدت حداقل ۱۲ و حداکثر ۳۰ هفته به صورت یک چند لایه سلولی چسبنده نگهداری می شود. سلول های بنیادی و سلول های میلوئید در حال بالغ شدن یا بالغ از لایه چسبنده به داخل محیط کشت رشد آزاد می شوند. سلول های پیش ساز گرانولوسیت/ ماکروفاژ را می توان در ژل های نرم سنجش کرد.

مواد

تمام معرف ها باید قبل از استفاده از نظر حمایت از رشد کشت ها آزمایش شوند.

استریل:

محیط کشت Fischer که با 50 U/mL پنی سیلین و 50 µg/mL استرپتومایسین تکمیل شده و حاوی (1/32 g/L) ۱۶ mM از $NaHCO_3$ می باشد.

محیط کشت رشد: Fischer مشابه قبل در مقادیر ۱۰۰mL که با ۱ µM هیدروکورتیزون، سدیم سوکسینات و ۲۰٪ سرم اسب تکمیل شده است(هیدروکورتیزون سدیم سوکسینات به صورت استوک ۱ mM در محیط کشت Fischer تهیه شده و در دمای ۲۰- °C نگهداری می شود).

سرنگ های ۱mL با سر سوزن های ۲۱ G

گاز، سواب، قیچی، پنس

فلاسک ها کشت بافت ۲۵ cm^2

غیر استریل:

پنج عدد موش: (C57BI/6 × DBA/2)

دستور کار

۱-موش دهنده را با قطع گردن(cervical dislocation) بکشید.

۲-پوست موش را با الکل ۷۰٪ مرطوب کرده و هر دو استخوان ران را جدا کنید. ۱۰ استخوان ران را در یک پتری دیش حاوی محیط کشت Fischer که بر روی یخ قرار داده شده جمع آوری کنید. یک استخوان ران حاوی $1/5-2 \times 10^7$ سلول هسته دار می باشد.

۳-در داخل یک هود لامینار فلو:

a) همه بافت های عضلانی باقیمانده را با استفاده از سواب های تنزیب تمیز کنید.

b) استخوان ران را با پنس نگه داشته و انتهای زانو را قطع کنید. سر سوزن ۲۱G باید به راحتی در شکاف استخوان جا شود.

c) تا حد ممکن انتهایی ترین قسمت دیگر استخوان ران را قطع کنید.

d) سر استخوان را در داخل یک بطری ۱۰۰mL محیط کشت رشد قرار داده و پیستون سرنگ را چندین مرتبه به داخل و خارج کشیده تا تمام مغز استخوان از استخوان ران خارج شود.

e) مراحل a-d را با ۹ استخوان دیگر تکرار کنید.

۴-با پی پیتینگ کردن با یک پی پت ۱۰mL، مغز استخوان را پخش کنید. نیازی نیست که توده های کوچک سلولی از هم جدا شوند.

۵-مقدار ۱۰ mL از سوسپانسیون سلولی را در فلاسک های کشت ۲۵ cm^2 توزیع کرده و فلاسک ها را چرخانده تا توزیع سلولها در کشت یکنواخت شود.

۶-فلاسک ها را با ۵٪ CO_2 در هوا گازدهی کرده و درپوش آنها را محکم کنید.

۷-کشت را به صورت افقی در دمای ۳۳ °C انکوبه کنید.

۸-کشت ها را هفته ای یک بار غذادهی کنید.

a) فلاسک ها را تکان داده تا سلول هایی که سست چسبیده اند به حالت تعلیق درآیند.

b) ۵ mL از محیط کشت رشد به انضمام سلولهای سوسپانسیون را خارج کنید؛ مراقب باشید پی پت با لایه سلولی چسبیده تماس پیدا نکند.

c) ۵ mL محیط کشت رشد تازه به هر فلاسک اضافه کنید؛ برای جلوگیری از آسیب، محیط کشت را مستقیماً بر روی لایه چسبیده توزیع نکنید.

d) کشت ها را گازدهی کرده و آنها را در انکوباتور قرار دهید.

تجزیه و تحلیل: سلول های جمع آوری شده در طی غذادهی را می توان با روش های مختلفی شامل: ریخت شناسی، سنجش های CFC و سنجش CFU-S *in vivo* برای سلول های بنیادی بررسی کرد.

آزمون های تشکیل دهنده کلنی در سلول های خونساز

سلول های پیش ساز سلول های خونساز ممکن است به صورت سوسپانسیون در محیط های کشت نیمه جامد در حضور فاکتور(های) رشد مناسب کلون شوند. بر حسب توان سلول های بنیادی جداسازی شده، کلنی های خالص یا مخلوط شده به دست خواهد آمد. آزمون های تشخیص سلول های تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت و ماکروفاژ (GM-CFC) ، واحدهای تشکیل دهنده اریتروسیت های پیوسته(BFU-E) ، سلول های تشکیل دهنده کلنی مخلوط (CFC-mix) و سلول های تشکیل دهنده کلنی گرانولوسیت، اریتروسیت، ماکروفاژ و مگاکاریوسیت (CFC-GEMM) توسط Testa و Molineux شرح داده شده و جایگاه آنها در فناوری روتین کشت سلولی خونساز قبلاً به خوبی مشخص شده است.

راندمان رشد کلنی ها در این سنجش ها با استفاده از متوسل به جای آگار بعنوان فاز نیمه جامد، افزایش می یابد. این روش باعث ایجاد کلنی های سفت تر شده که ارزیابی و شمارش آنها را آسانتر می کند و چون متوسل یک مایع با ویسکوزیته بالا می باشد و مانند آگار شبیه ژل نمی باشد، سلول ها در آن هر چند آهسته ته نشین شده و در قاعده پلاستیکی پلیت قرار می گیرند. این روش برای مشاهده بعدی، همه آنها را در یک سطح کانونی قرار می دهد. اگر سلولها در

یک اتمسفر حاوی ۵٪ CO_2 در هوا رشد داده شوند کلنی ها تشکیل خواهند شد اما این ممکن است به دلیل خونسازی کافی باشد و در شرایط بهینه فاز گازی باید شامل ۱۰٪ CO_2 و ۵٪ O_2 در هوا باشد. اگر انکوباتوری با این مخلوط گازی در دسترس نمی باشد می توان از یک کپسول با گازهای مخلوط استفاده کرد. دیش ها را در یک جعبه پلاستیکی دارای درپوش که یک سوراخ در آن وجود دارد قرار دهید . جعبه را با نوار پلاستیکی پوشانده و قبل از پوشاندن از طریق سوراخ آنرا گازدهی کنید. یک دیش حاوی آب در داخل جعبه محیط داخل آن را مرطوب نگه خواهد داشت.

دستور کار۲۲-۱۵- آزمون های سلول های خونساز تشکیل دهنده کلنی

طرح کلی

سلول های مغز استخوان را در آگار یا متوسل (methocel) به حالت تعلیق درآورده و سلول ها را به همراه فاکتورهای رشد مناسب در داخل دیش ها بذرافشانی کنید.

مواد

استریل یا تهیه شده در شرایط استریل:

سلول های مغز استخوان(دستور کار ۲۱-۱۵ مراحل۴-۱). سلول های هسته دار را بعد از رنگ آمیزی آنها با متیلن بلو با یک هموسیتومتر شمارش کرده یا سلول ها را با Zapoglobin لیز کرده و هسته ها را توسط دستگاه شمارشگر الکترونی شمارش کنید. هر استخوان ران باید $10^7 \times 1/5-1$ سلول بدهد.

متیل سلولز ۴۰۰۰ cP

نوبل آگار

استوک Alpha MEM

FBS

فاکتورهای رشد (جدول۲-۱۵) به صورت نوترکیب یا از یک محیط کشت شرطی

BSA ۱۰٪ در D- PBSA

پتری دیش های ۳ cm

محیط کشت شرطی wehi-cell (wehi-CM) . wehi 3B یک رده سلولی میلومنوسیتی موشی بوده که وقتی کشت شود، در محیط کشت تولید IL-3 می کند.

متیل سلولز

a) ۷/۲ g متوسل را وزن کرده و آن را به یک بطری ۵۰۰ mL حاوی یک میله مغناطیسی بزرگ اضافه کنید.

b) متوسل را با اتوکلاو کردن استریل کنید.

c) UPW ۴۰۰ mL استریل که تا ۹۰°C حرارت داده شده را به متوسل مرطوب اضافه کنید.

d) مخلوط را در دمای ۴ °C به مدت یک شب بر روی همزن مغناطیسی قرار داده تا همزنی شود. اکنون محلول متوسل ×۲ می باشد. روش دقیق تر این است که برای توزیع متوسل به جای استفاده از پی پت از یک سرنگ (بدون سر سوزن)استفاده شود.

محلول استوک محیط کشت آلفا:

a) پودر محیط کشت آلفا (جعبه ۱۰L)

b) استوک ویتامین MEM ×۱۰۰، به میزان ۱۰۰mL

c) سولفات جنتامایسین ۲۰۰ mg

d) محیط کشت را بر روی یک همزن هیتر دار همزده تا حل شود و آن را با UPW به حجم ۳ لیتر برسانید(اجازه ندهید که درجه حرارت بالاتر از ۳۷ °C برود). قبل از فیلتراسیون نهایی با یک فیلتر ۰/۲۲ µm، بهتر است محیط کشت را با استفاده از فیلترهای ردیفی با قطر منافذ ۵، ۱/۲، ۰/۸ و ۰/۴۵ µm پیش فیلتر کنید. محیط کشت را در مقادیر ۲۱ mL توزیع کرده و آن را در حجم های از قبل اندازه گیری شده در دمای ۲۰°C- نگهداری کنید.

محیط کشت آلفا ×۲ :

a) محلول استوک محیط کشت آلفا، ۲۱ mL

b) FBS، ۲۵ mL

c) گلوتامین (۲۰۰ mM)، ۱ mL

d) ٪ ۷/۵ NaHCO3، ۳ mL

مواد بالا در یک بطری استریل مخلوط کرده و دمای آن را به ۳۷°C برسانید.

غیر استریل:

به همراه آگار، از دو حمام آب یکی در دمای ۳۷°C و دیگری در دمای ۵۵°C استفاده کنید.

انکوباتور: فاز گازی ۱۰٪ CO_2 ، ۵٪ O_2 و ۸۵٪ N_2

دستور کار A: BFU-E، CFC-Mix و CFU-GEMM

۱-یک حجم مساوی از محیط کشت آلفا × ۲ که ۱٪ BSA به آن افزوده شده است را با متوسل ×۲ مخلوط کرده تا مقدار مورد نیاز از محیط کشت برای آزمایش ساخته شود. مخلوط را سرد نگه دارید : متوسل وقتی سرد است بیشتر مایع می شود.

۲-کشت ها را با سه تکرار انجام دهید اما مخلوط کافی برای ۴ دیش بسازید چون متوسل به دیواره لوله ها چسبیده و همیشه مقداری از آن از دست می رود.

۳-غلظت مورد نظر از فاکتورهای رشد را به لوله اضافه کنید(جدول ۲-۱۵)

۴-5×10^4 سلول اضافه کنید.

۵-حجم کل را با افزودن محیط کشت ×۱ به ۴/۴ mL رسانده و لوله ها را روی یک ورتکس مخلوط کنید.

جدول۲-۱۵: افـزودن سـلول هـا و فاکتورهـای رشـد بـرای آزمون های تشکیل دهنده کلنی

Assay	IL-6	rMurGM[a]	rIL-3[b]	Epo	Cells	Incidence/10^5
		Growth Factors/mL				
BFU-E		0.1 ng	1 ng	2 U	5×10^4	40–80
CFC-mix			1 ng	2 U	5×10^4	100–180
CFU-GEMM	100 ng		1 ng	2 U	5×10^4	92–106

[a]10% AF1-19T CM can be substituted for GM-CSF [Pragnell et al., 1988].
[b]10% Wehi-CM can be substituted for rIL-3 [Bazill et al., 1983].

۶-بـا اسـتفاده ازیـک سـرنگ ، ۱mL از محـیط کـشت را در پلیت های ۳cm که مخـصوص کـشت بافـت نمـی باشـند کشت دهید.

۷-کشت را در دمـای ۳۷ °C در یـک اتمـسفر مرطـوب دارای ۱۰٪ CO_2 و ۵٪ O_2 در هـوا بـه مـدت ۱۵-۸ روز انکوبـه کنید.

شناسایی کلنی ها

کلنی های BFU-E می توانند به صورت کلنی های منفـرد که از سلول های بسیار کوچک تشکیل شده اند یـا بـه صـورت کلنی های چند مرکزی (پشت سرهم) که هر کدام از سلول های قرمز یا صورتی بسیار کوچک که بـه صـورت محکـم در کنـار یکدیگر قرار گرفته اند، باشند. میـزان بـروز اینگونـه کلنـی هـا ۴۰-۸۰/۱۰^{5} سلول مغز استخوان می باشد.

کلنی های CFC-mix مـی تواننـد بـه صـورت کلنـی هـا فشرده منفرد معمولاً با یک هاله سلولی بـا انـدازه بـسیار متغیـر باشند. آنها ممکن است چند مرکزی باشند اما جمعیـت سـلولی به میزان زیادی ناهمگون می باشد. میزان بروز کلنی هـا در ایـن آزمون بین ۱۰۰-۱۸۰/۱۰^{5} سلول مغز استخوان می باشـد کـه از بین آنها فقط حدود ۱۰٪ کلنی ها مخلوط حـاوی سـلول هـای اریتروئید می باشند. اگر سـلول هـای اریتروئیـد قرمـز نباشـند، تشخیص صحیح کلنی ها توسط افراد غیر متبحر بـسیار مـشکل می باشد. باید از کلنی ها عکس گرفته شـود و سـپس انتخـاب شده و سپس باید نمونه های سیتوسـانتریفوژ سـاخته شـود کـه بتواند فیکس شده و با گیمسا ۱۰٪ رنگ شوند.

دستور کار B: GM-CFC

۱-دیش های ۳ cm که مخصوص کشت بافـت نمـی باشـند را نشانه گذاری کنید.

۲-یک محیط کشت آگار ۰/۳٪ بسازید و آن را در دمای ۳۷ °C نگهداری کنید.

۳-سلول های مغز استخوان را تهیه کنید. سلول های هـسته دار را بعد از رنگ آمیزی سلول ها با متیلن بلـو شـمارش کـرده یـا سلول ها را با Zapoglobin لیز کرده و هـسته هـا را بـا یـک شمارشگر سلولی الکترونیک شمارش کنیـد. هـر اسـتخوان ران دارای ۱-۱/۵×۱۰^{7} سلول هسته دار خواهد بود.

۴-۰/۱ ng/mL از rMurGM-CSF به هر کدام از دیش هـا اضافه کنید.

۵-۱ mL محیط کـشت آگـار حـاوی ۷/۵×۱۰^{4} سـلول اضـافه کرده وآن را چرخانده تا سلول ها با آگار مخلوط شـوند. اجـازه دهید آگار در درجه حرارت اتاق تنظیم شود.

۶-همچنین می توان از محیط کشت متوسل ۰/۸٪ استفاده کـرد. این روش معمولاً کلنی های سفت تری داده که شمارش آنها را آسانتر می کند.

۷-دیش ها را در یک جعبه پلاستیکی قرار دهید.

۸-دیش ها را به مدت ۶ روز در انکوبـاتور مرطـوب در دمـای ۳۷ °C در یک اتمسفر حاوی۵ ٪ CO_2 در هوا قرار دهید.

۹-با استفاده از میکروسکوپ معکوس، کلنی هایی را کـه دارای بیش از ۵۰ سلول می باشند شمارش کرده و تعداد را به صورت تعداد کلنی در ۱۰^{5} سلول بذرافشانی شده بیان کنید.

۱۰-GM-CFC در مغز اسـتخوان طبیعـی ۱۰۰-۱۲۰/ ۱۰^{5} سلول می باشد.

گنادها

سلول هـای گرانولـوزا تخمـدان (ovarian granulosa cells) را می تـوان نگهـداری کـرد و ظـاهراً در کـشت اولیـه کارکردی می باشند اما عملکردهای اختصاصی در طی واکـشت از دست می رود. یک رده سلولی که از تخمدان هامستر چینـی شروع شده (CHO-KI) برای سالیان درازی کـشت داده شـده است اما نژاد آن هنوز شناسایی نشده است. هر چند اپی تلوئید در بعضی مراحـل رشـد، زمـانی کـه در دی بوتیریـل cAMP کشت شود، یک تغییر شبه فیبروبلاستی را طی می کند.

قـسمت هـای سـلولی بیـضه بـا روش تـه نـشینی سـرعت جداسازی شده اند، اما هیچ گونه کشت طـولانی مـدت از آنهـا گزارش نشده است. TM4 یک رده اپی تلیال از بیـضه مـوش می باشد، هر چند اشکال تمایز یافته آن گـزارش نـشده اسـت. همچنین سلول های سرتولی بیضه هم کشت داده شده اند.

فصل شانزدهم

رفع مشکلات

صرف نظر از این که یک آزمایشگاه چگونه اداره می شود، زمانی که کارکنان جدید، تکنیکهای جدید یا هر پیشرفت جدید، جریان طبیعی کارها را ناپایدار می کند، مشکلات رخ خواهند داد. یک راه حل برای این گونه مشکلات این است که مطمئن باشیم که روش ها تغییر نمی کنند، یعنی روشهای کار استاندارد، تعریف شود و مطمئن شویم که تغییر این روشها فقط پس از آزمایش جامع همه واکنش های ممکن صورت می پذیرد. هر چند اغلب این کار مشکل می باشد به خصوص در یک محیط تحقیقاتی که پیشرفت نیازمند تغییر پیوسته و روش های جدید می باشد.

توصیه های پیشنهادی در فصل های قبل بر روی دستور کارهای عملی "چگونه آن را انجام دهیم" و گاهی اوقات با تعیین این که چه چیزی ممکن است باعث اشتباه شود تمرکز داشت. در این فصل تلاش می شود که این مشکلات بالقوه تحت عناوین موضوعی خلاصه شود و مشکلات بالقوه، پرسش ها و راه حل های بیشتری پیشنهاد شود.

رشد سلولی آهسته

مشکلات محدود به استوک های شما

۱- سلولها را از لحاظ آلودگی چک کنید.

a) اگر بدون آنتی بیوتیک کار می کنید (و شما مجبور به این کار هستید!) بیشتر آلودگی ها آشکار خواهند بود.

i) با چشم غیر مسلح و توسط میکروسکوپ آن را بررسی کنید.

ii) در صورت آلوده بودن سلولها را دور بریزید.

b) آلودگی میکوپلاسمایی آشکار نخواهد بود و شما باید به طور منظم سلولها را از لحاظ آلودگی میکوپلاسمایی چک کنید.

c) راهها یا علت های بالقوه را چک کنید.

۲- رشد سلولهای خود را با محیط های کشت و سرم های دیگر چک کنید (یعنی از یک بچ یا شرکت سازنده متفاوت). اگر شما به طور معمول از پودر با غلظت × ۱۰ استفاده می کنید، یک استوک × ۱ بخرید. اگر این تغییر نشان داد که مشکل به محیط کشت مربوط است، به قسمت بعدی که در مورد محیط کشت است در همین بخش رجوع کنید.

۳- اگر مشکل مربوط به محیط کشت نبود، ممکن است مربوط به سلولهای شما باشد.

a) آمپول دیگری را از حالت انجماد ذوب کرده و آن را با استوک قبلی خود مقایسه کنید. به طور مجزا با دو کشت کار شود تا مبادا یک آلودگی در استوک اصلی داشته باشید. این کار را قبل از چک کردن (یا ضمن چک کردن) مراحل b –d در زیر انجام دهید :

b) سلولها را در هنگام واکشت شمارش کرده و یک منحنی رشد تهیه کرده تا آن را با نتایج قبلی برای این سلولها مقایسه کنید. بررسی کنید که آیا موارد زیر در مورد سلولهای شما صادق است :

i) دانسیته بذرافشانی در زمان انتقال بسیار کم بوده است.

ii) سلولها خیلی زیاد واکشت داده شده اند.

iii) سلولهای برای مدت زمان بسیار طولانی قبل از واکشت در فاز سکون باقی مانده اند.

c) آیا در بچ تریپسین یا عامل جدا کننده دیگر تغییری حاصل شده است؟ شماره بچ و شرکت های سازنده چک شود.

d) برای تعیین شدت جداسازی، چک شود که آیا

i)مدت زمان مجاورت با تریپسین(یا عوامل دیگر) خیلی طولانی بوده است.

ii)عامل جدا کننده خیلی غلیظ بوده یا فعالیت ویژه بالایی داشته است.

iii) انکوباتور مورد استفاده برای تریپسینه کردن خیلی گرم بوده است.
iv) پی پتینگ در طی جدا سازی خیلی شدید بوده است.
v) سلولها نسبت به EDTA حساس بوده اند(در صورت استفاده از EDTA).
vi) از رقیق کننده نامناسب برای تریپسین استفاده شده است.
vii) از یک بچ نامناسب از رقیق کننده تریپسین استفاده شده است.

مسئله عمومی تر بوده و افراد دیگر هم دچار مشکل شده اند

مواد و وسایل مشترک چک شود.

گرمخانه و انکوباتورها

۱) درجه حرارت وثبات آن به طور نامناسب کنترل شده است.
a) ترموستات خراب است.
b) دفعات استفاده از انکوباتور زیاد است.
c) در گرمخانه باز گذاشته شده است.
d) فن(های) گردش دهنده هوا خراب شده اند یا گرمای بیش از حد تولید می کنند.

با استفاده از دماسنج دستی ثبت کننده، انکوباتورها را چک کنید.

۲) رطوبت انکوباتور CO_2 حفظ نشده است.
a) سینی آب پر نشده است.
b) در اطراف درها نشتی وجود دارد.
c) دسترسی به انکوباتور خیلی زیاد است.
d) میزان تبخیر را با وزن کردن پتری دیش حاوی PBSA به صورت روزانه چک کنید.

۳) غلظت CO_2 در انکوباتور CO_2 به طور صحیح کنترل نمی شود.
a) تعداد دفعات باز کردن در انکوباتور زیاد است.
b) کنترل کننده CO_2 دارای مشکل می باشد.

۱- با یک پتری دیش حاوی محیط کشت از قبل آزمایش شده، pH را در محل چک کنید.
۲- هوای انکوباتور را با CO_2 سنج(Carborite) چک کنید .
۳- با مخلوط های گازی استاندارد، غلظت CO_2 و تنظیمات صفر را مجدداً کالیبره کنید.

آیا تغییری در آزمایشگاه صورت گرفته است؟

کارکنان

۱- کارکنان کشت
۲- کارکنان آماده سازی
۳- روش های آماده سازی
۴- کار آموزی
۵- تخصیص فضا : ازدحام بیش از حد

محیط های کشت

۱- شرکت تولید کننده
۲- بچ
۳- نوع
۴- ذخیره سازی

روش های کار

۱- زمان های انکوباسیون
۲- سرعت انجام کار
۳- مراحل انجام کار
۴- موقعیت
۵- مقیاس

تجهیزات

۱- جایگزینی ها : آیا تجهیزات تازه ای اضافه شده است؟
۲- وضعیت عملیاتی : آیا وسیله ای خراب شده است؟
۳- موقعیت : آیا مکان یا موقعیت تجهیزات مورد استفاده یا تجهیزات مجاور تغییر کرده است؟
۴- درجه حرارت عملکردی : آیا تجهیزات در محدوده درجه حرارت بهینه کار می کنند؟

محیط کشت

آیا مشکلات مربوط به استوک شما یا استوک های عمومی می باشد؟

سن

۱- شماره بچ و تاریخ خرید محیط کشت را چک کنید. این مدت نباید بیش از یک سال باشد.
۲- اگر محیط کشت دارای گلوتامین باشد در دمای۴°C فقط به مدت ۱ ماه پایدار است.

شرایط ذخیره سازی

۱- بررسی شود که درجه حرارت سردخانه یا یخچال برابر ۴°C و یا کمتر می باشد.
۲- چک شود که محیط کشت در تاریکی و یا حداقل زیر نور تنگستن ذخیره شده است. در غیر این صورت محیط کشت در زیر نور فلورسنت تجزیه خواهد شد مگر این که نور خروجی، UV اندکی داشته باشد.

کیفیت محیط کشت

۱- محیط کشت را با محیط های کشت دیگر مقایسه کنید.
۲- محیط کشت با غلظت ×۱ خریده و آن را با محیط کشت خود مقایسه کنید.
۳- در صورتی که شما از محیط کشت ×۱ استفاده می کنید، سعی کنید که از شرکت سازنده دیگر محیط کشت را تهیه کرده و افزودنیهای اختصاصی چک شود (مثلاً سرم، فاکتورهای رشد، هورمون ها و غیره).

تعداد دفعات تعویض محیط کشت

غلظت سلولی و pH را چک کنید. اگر pH در کمتر از ۴۸ ساعت به زیر ۷ کاهش یافت، pH در شروع دوره رشد خیلی کم بوده، غلظت سلولی خیلی بالاست یا آلودگی وجود دارد.

خصوصیات محیط کشت

pH

چک شود که pH در کل دوره کشت بین ۷ و ۷/۴ می باشد.

در صورتی که نوسانات pH وجود دارد

۱- مخزن CO_2 متصل به انکوباتور چک شود(به قسمت تجهیزات در بالا رجوع شود)

۲- وضعیت تنظیم CO_2 انکوباتور چک شود (به قسمت تجهیزات در بالا رجوع شود)

اگر pH خیلی بالاست

a) غلظت CO_2 در انکوباتور خیلی کم است.

b) غلظت HCO^-_3 محیط کشت خیلی زیاد است.

c) در صورتی که از DMEM استفاده می کنید، اگر براساس دستور العمل اصلی ساخته شده باشد باید با فاز گازی ۱۰٪ CO_2 استفاده شود.

اسمولالیتی؛ محیط کشت ممکن است هیپرتونیک یا هیپوتونیک باشد

۱) اگر محیط کشت استوک به طرز صحیح تهیه نشده باشد

۲) اگر یکی از اجزاء محیط کشت اشتباه باشد

۳) اگر روش رقیق سازی اشتباه باشد

۱- اسمولالیتی را با یک اسمومتر چک کنید؛ اسمولالیتی باید بین ۲۷۰ و ۳۴۰ mOsmol/kg باشد.

۲- روش های تهیه را چک کنید.

a) آیا مقدار آب مورد استفاده برای رقیق کردن یک استوک ×۱۰ یا برای حل کردن پودر صحیح می باشد؟

b) آیا معرفی اضافه شده است که اسمولالیتی را تغییر داده باشد؟

حذف تصادفی یک جزء

۱- یک بچ تازه محیط کشت تهیه کنید (که سریعتر از این است که سعی کنید بفهمید که کدام جزء حذف شده است).

۲-اگر یک جزء از محیط کشت حلالیت ضعیفی داشته باشد یا قبل از فیلتراسیون رسوب کند، چک کنید که مطمئن شوید همه اجزاء تشکیل دهنده قبل از فیلتراسیون حل شده اند.

۳- اگر در هنگام ذخیره سازی رسوب وجود دارد، چک شود که رسوب در هنگام ذخیره سازی و یا گرم کردن تا ۳۷°C مجدداً حل شود.

۴- اگر رسوب مجدداً حل نشود، بچ را دور بریزید.

۵- اگر رسوب گذاری مجدداً تکرار شد، مشکل را با شرکت سازنده در میان گذاشته یا شرکت سازنده را عوض کنید.

جزء فاسد

۱-اجزاء را از یک منبع دیگر جایگزین کنید.

۲- شماره بچ ها را ثبت کنید و از آن یک بایگانی تهیه کنید.

بچ جدید از محیط کشت استوک که به نظر می رسد معیوب باشد

۱- بچ را با یک بچ قبلی (در صورت موجود بودن) مقایسه کنید.

۲- اگر بچ های قبلی موجود نباشد بچ را با یک بچ از شرکت سازنده دیگر مقایسه کنید.

اگر محیط کشت بر اساس BSS می باشد، آیا کیفیت BSS رضایت بخش است؟

۱- با مصرف کنندگان دیگر چک کنید.

۲- منابع دیگر BSS یا یک فرمولاسیون متفاوت چک شود.

اگر محیط کشت بر اساس آب است، آیا کیفیت آب فوق العاده خالص رضایت بخش است؟

۱- با مصرف کنندگان دیگر چک شود.

۲- با محیط کشت ×۱ تازه مقایسه شود.

گزینش

آیا محیط کشت از زمانی که سلولها به دست آمده اند تغییر کرده است؟

۱- دوباره از محیط کشت قبلی استفاده کنید یا اگر محیط کشت اصلی غیر قابل دسترس یا نامناسب می باشد، محیط کشت های مختلف را امتحان کنید.

۲- محیط کشت را از همان شرکت تولید کننده رده سلولی تهیه کنید.

۳- اجزاء سازنده محیط کشت را با محیط های کشت شرکت تولید کننده رده سلولی مقایسه کنید.

اگر یک کشت تازه را شروع می کنید:

۱- چندین محیط کشت را برای پارامتر های زیر غربال کنید:

a) نوع محیط کشت

b) نوع سرم

c) غلظت سرم

۲- محیط های کشت فاقد سرم را غربال کنید.

a) بر حسب معیارهای بافتی انتخاب شود مثلاً MCDB 153 برای کراتینوسیت های اپیدرمی

b) مکمل سازی با فاکتورهای رشد بررسی شود.

۳- لایه تغذیه کننده و محیط کشت شرطی شده بررسی شود.

معرف های ناپایدار

گلوتامین

۱- آن را به صورت منجمد در دمای ۲۰°C − ذخیره کنید.

۲- چون در عرض ۵-۳ روز در دمای ۳۷ °C میزان گلوتامین به ۵۰٪ کاهش می یابد، بعد از ۳ روز محیط کشت را جایگزین کنید.

۳- از انواع پایـدار مثـل دی پپتیـد گلوتامـاکس (dipeptide Glutamax) استفاده کنید اما آن را ابتدا آزمایش کنید.

سرم

۱- آن را به صورت منجمد ذخیره کنید.

۲- اگر سرم به صورت نـا کامـل ذوب شـد، آن را بـه صـورت کامل ذوب کرده، مخلوط نمایید و دوباره منجمد کنید.

۳- بچ های سرم را قبل از استفاده آزمایش کنید.

۴- در موردی که آشکار شدن یک نقص آهسته می باشد، بچ ها را همپوشانی دهید(ممکن است ۳-۲ واکشت طول بکشد).

اجزاء سازنده دیگر

۱- در دمای ۴ °C ذخیره شوند.

۲- بیشتر اجزاء سازنده محیط های کشت به مدت ۲-۱ هفته در دمای ۳۷ °C پایدار می باشند.

۳- مکمل ها را در مقادیری که فقط یک بار استفاده مـی شـوند ذخیره کنید و محلول های استوک را به صورت مکرر ذوب و منجمد نکنید.

تریپسین

۱- استوک تغلیظ شده را به صـورت منجمـد در مقـادیری کـه برای یک بار استفاده مناسب می باشد ذخیره کنید.

۲- با استوک غلیظ آن را تهیه کرده و محلول رقیق شده را دمای ۴°C برای حداکثر ۲ هفته ذخیره کنید.

۳- اگر تریپسین به مدت بیش از ۳۰ دقیقـه در درجـه حـرارت اتاق قرار داده شود تجزیه خواهد شد.

خلوص اجزاء سازنده

آیا دستگاه خالص ساز آب درست کار می کند؟

کیفیت محصول

۱- قابلیت هدایت(conductivity) آب را آزمایش کنید.

۲- مقدار مواد آلی موجود در آب را آزمایش کنید.

۳- محیط کشت سـاخته شـده بـا آب را بـا محـیط کـشت ×۱ مقایسه کنید.

رژیم نگهداری (maintenance regime)

۱- چه موقع برای آخرین بار بخش دیونیزه کننده تعویض شده است؟

۲- چه موقع کارتریج اسمز معکوس تعویض شده است؟

۳- آیا همه لوله های متصل کننده تمیز می باشند؟ آیا هیچ گونه علایمی از جلبک، قارچ یا باکتری وجود دارد؟

۴- مخزن ذخیره سازی از نظر آلودگی قارچی یا جلبکـی چـک شود.

۵- از نظر آزاد سازی رزین دیونیزه کننده در آب خروجی چک شود.

۶- از لحاظ آلودگی شیمیایی یا وجود باقیمانـده هـا در مخـزن شیشه ای دستگاه آب مقطر چک شود.

a) مولد بخار شیشه ای را جدا کنید.

b) آن را با اسید کلریـدریک یـک مـولار تمیـز کـرده و کـاملاً آبکشی کنید.

c) جوشنده اولیه دستگاه تقطیر را دور بیاندازید.

مواد شیمیایی در لوله های پلاستیکی

۱- لوله ها را جدا کرده و تمیز نمایید.

a) لوله ها را در دترژنت داغ غوطه ور کنید.

b) در اسید کلریدریک یک مـولار غوطـه ور کـرده و شستـشو دهید.

c) در آب دیونیزه کاملاً شستشو دهید.

d) بچ اولیه آب را دور ریخته و مجدداً لوله ها را در جای خود قرار دهید.

۲- لوله های قبلی را با لوله های جدید، خنثـی، شـسته شـده و استریل تعویض کنید.

بی کربنات

آیا غلظت آن درست است؟

۱- قابلیت هدایت یا اسمولالیتی را بـا یـک محلـول اسـتاندارد مرجع مقایسه کنید.

۲- از یک بچ دیگر استفاده کنید.

۳- از لحاظ علایم رسوب چک شود.

غلظت نادرست

۱- چک کنید که آیا شما مقدار صحیحی بـرای کـشت اسـتفاده کرده اید.

۲- غلظت CO_2 درون انکوباتور چک شود.

آنتی بیوتیک ها

مشکلات ممکن است ناشی از موارد زیر باشد :

۱) تعداد دفعات استفاده

۲) غلظت

۳) شماره بچ

۴) ترکیب ها

۵) قارچ کش(مثلاً آمفوتریسین B می تواند سمی باشد)

سرم

آیا شما از یک بچ جدید استفاده می کنید؟

۱- کنترل کیفیت شرکت سازنده چک شود.

۲- بچ با بچ قبلی یا بچ های دیگر مقایسه شود.

غلظت

بسیار کم؟ بسیار زیاد؟

۱- فقدان سمیت، ارتقاء رشد و کارایی پلیتینگ را مجدداً تأیید کنید

a) یک منحنی رشد تهیه کنید.

b) یک سنجش رشد کلونال را تهیه کنید.
۲- تعویض سرم را امتحان کنید
a) با یک نوع جدید سرم
b) با محیط کشت فاقد سرم
c) با جایگزین سرم

پلاستیک ها

آیا شما از یک ترکیب، نمونه یا بچ جدید استفاده می کنید؟
۱- بچ خود را با بچ قبلی چک کنید.
۲- سعی شود از یک شرکت تولید کننده دیگر استفاده شود.

شیشه آلات

شستشو

آیا سلولهای دیگر نشانه هایی از زوال یا رشد معیوب را نشان می دهند؟
آیا مصرف کنندگان دیگر دارای مشکل می باشند؟
آیا آلودگی اندک بر روی شیشه بطری های ذخیره سازی یا پی پت ها وجود دارد؟
آیا درپوش ها درست آبکشی نشده اند؟(اگر دترژنت در درپوش باقی مانده باشد افزودن چند میلی لیتر BSS با تغییر pH نشان داده خواهد شد).
آیا شیشه آلات مخصوص مواد شیمیایی با شیشه آلات کشت بافت مخلوط شده اند؟

آلودگی میکروبی

محدود به یک مصرف کننده

پراکنده

گونه های منفرد

۱- تکنیک آسپتیک کاربر چک شود.
۲- آیا محیط های کشت یا معرف هایی وجود دارد که مخصوص همان مصرف کننده باشد؟
۳- نظافت شخصی کاربر چک شود.
a) آیا دست ها قبل و بعد از کار کشت شستشو می شود.
b) آیا روپوش آزمایشگاهی عوض می شود.
c) آیا موهای بلند در پشت سر بسته می شود؟
۴- کاربر مجاب به پوشیدن دستکش شود.

میکوپلاسما

۱- با مصرف کنندگان دیگر از نظر شواهد آلودگی میکوپلاسمایی چک شود.
۲- مطمئن شوید که برنامه غربالگری مؤثر باشد.
۳- رده های سلولی وارد شده، منبع رایج عفونت می باشند، قبل از غربالگری برای استفاده در ناحیه اصلی کشت بافت آنها را قرنطینه کنید. در هنگام ورود از آنها لیست بایگانی تهیه کنید.
۴- معرف های محصولات طبیعی(سرم، تریپسین) را با یک رده سلولی نشانگر چک کنید.

آلودگی مختلط با چند گونه (Multispecific contamination)

ممکن است به دلیل خطا در تکنیک استریل باشد.
۱- مطمئن شوید که همه روش های صحیح حفظ شده اند.
a) هود به هم ریخته نمی باشد.
b) مواد قبل از قرار گرفتن در هود سواب شده اند.
c) اگر ماده ای کف هود ریخت بلافاصله پاک می شود.
۲- استفاده از روپوش های آزمایشگاهی چک شود:
a) آیا قبل از شروع کار کشت روپوش آزمایشگاهی تعویض می شود؟
b) آیا دکمه های روپوش آزمایشگاهی بسته است؟ (حتی عبور افرادی که روپوش آنها باز می باشد می تواند جریان هوای لامینار را به هم زند).
۳- با افرادی که از همان هود استفاده می کنند چک شود؛ ممکن است هود خراب بوده و نیاز به سرویس داشته باشد.

آلودگی مکرر

آلودگی با یک گونه : معمولاً مشکل مربوط به معرف یا رده سلولی می باشد.
۱- معرفی را که هیچ کس دیگری استفاده نمی کند چک کنید.
۲- آیا رده سلولی برای آن مصرف کننده منحصر به فرد می باشد؟

آلودگی مختلط با چند گونه

۱- تکنیک استریل چک شود.
۲- روش های غیر استاندارد چک شود.
۳- وضعیت مکانی چک شود : آیا وسایل یا ترافیک زیادی وجود دارد؟
۴- آیا زیر هود پرازدحام می باشد؟
۵- آیا از معرف های غیراستریل استفاده شده است؟
۶- استفاده از روپوش های آزمایشگاهی چک شود.

آلودگی پیوسته

آلودگی با یک گونه

محلول آلوده

۱- محیط کشت (بدون آنتی بیوتیک) را به نسبت ۱:۱ با نوترینت براث (مثل L-broth) مخلوط کرده و محلول را انکوبه کنید.
۲- محیط کشت را بر روی بلاد آگار (blood agar) کشت داده و محلول را به همراه کنترل های بلانک انکوبه کنید.

رده سلولی آلوده

۱- سلولها را با رنگ آمیزی Hoechst بررسی کنید.
۲- سلولها را با براث مخلوط کرده و انکوبه کنید.

آلودگی مختلط با چند گونه

۱- تکنیک استریل چک شود.
۲- روش های غیراستاندارد چک شود.
۳- وضعیت مکانی چک شود: آیا وسایل یا ترافیک زیادی وجود دارد؟
۴- چک شود که چه مقدار وسیله به طور هم زمان در هود وجود دارد : آیا زیر هود پرازدحام است؟
۵- چک شود که آیا معرف های غیر استریل استفاده می شود (به صورت سهوی یا عمدی).

آلودگی گسترده

آلودگی پراکنده

آلودگی با یک گونه منفرد

معرفی که بندرت استفاده می شود یا محیط کشتی که ممکن است آلوده باشد چک شود.
۲- انکوباتورها چک شوند. در صورت نیاز تمیز شوند.
۳- با استفاده از پلیت های باکتریولوژی زمانی که اتاق آرام است، شمارش اسپورها در محیط اتاق چک شود.

آلودگی مختلط با چند گونه

نقص در استریل کردن

۱- آون های استریل کننده از لحاظ موارد زیر چک شوند:
a) ازدحام بیش از حد وسایل از جریان هوا به اندازه کافی ممانعت می کند.
b) درستی مهروموم بودن در و هر گونه روزنه موجود
c) درجه حرارت و مدت زمان چرخه استریلیزاسیون (۱۶۰°C به مدت یک ساعت)
۲- اتوکلاوها چک شوند:
a) ازدحام زیاد محتویات از جریان بخار به اندازه کافی ممانعت می کند.
b) درجه حرارت و مدت زمان چرخه استریلیزاسیون (۱۲۱°C به مدت ۲۰- ۱۵ دقیقه) با یک نشانگر در یک نمونه مشابه در مرکز بار
c) برای اطمینان از این که تمام ظروف خالی برای جریان بخار باز گذاشته شوند.

عضو جدید کارکنان که از روش های استاندارد پیروی نمی کند

۱- آموزش کارمند جدید با سرپرست بررسی شود.
۲- روش های کارآموزی در صورت نیاز به روز شود.

مخزن آلوده (مثل سردخانه یا یخچال)

۱- وسیله ذخیره سازی را تمیز کنید.
۲- مطمئن شوید که وسایل استریل شده بدون پوشش ذخیره نشده اند.
۳- بازگردش استوک های استریل چک شود.

آلودگی مکرر، با یک گونه منفرد

معرف یا محیط کشت آلوده

۱- تعداد دفعات استفاده از معرف ها در میان مصرف کنندگان چک شود تا مشکل در میان معرف های عمومی محدود شود.
۲- نمونه های مشکوک را با انکوبه کردن به نسبت ۱:۱ در براث آزمایش کنید.
۳- انکوباتور را از لحاظ آلودگی بررسی کرده و در صورت نیاز آن را تمیز کنید.
۴- هود را از لحاظ آلودگی بررسی کنید.
a) سطح کار و اطراف آن را با ضدعفونی کننده فنولی در الکل ۷۰٪ سواب کنید.
b) زیر سطح کار را با ضدعفونی کننده فنولی در الکل ۷۰٪ سواب کنید.
c) مجاری دیگر را از نظر نشت و آلودگی چک کنید.
d) درستی فیلتر را با بادسنج (anemometer) یا پلیت های نوترینت آگار (nutrient agar) چک کنید.
e) کثیف بودن یا مسدود بودن فیلترها مثلاً با کاهش فشار در عرض فیلتر بررسی شود.
f) برنامه تمیز کردن را چک کرده و در صورت نیاز آن را به روز کنید.
۵- برنامه نگهداری را چک کرده و در صورت نیاز آن را به روز کنید.

آلودگی مکرر، مختلط با چند گونه

نقص در استریلیزاسیون

۱- اتوکلاوها و آون ها را از نظر ازدحام چک کنید.
۲- اتوکلاوها و آون های استریل کننده را از لحاظ خرابی های مکانیکی یا الکترونیکی چک کنید.
۳- نتایج چاپی (printotus) و اسناد چرخه های استریلیزاسیون چک شود.
۴- درستی محفظه های استریلیزاسیون آون ها چک شود.
۵- بررسی شود که آیا عضو جدید از کارکنان از روش های استاندارد پیروی نمی کند.
۶- آموزش کارکنان جدید چک شود.
۷- روش ها با سرپرست چک شود.
۸- استفاده از آنتی بیوتیک ها محدود شود.
۹- تغییر در روش ها و یا نیازمندی ها چک شود.

مخزن آلوده (مثل سردخانه یا یخچال)

۱- وسیله ذخیره سازی را تمیز کنید.
۲- مطمئن شوید که اشیاء استریل شده بدون پوشش ذخیره نشده اند.

هوای اتاق آلوده

۱- با قرار دادن پلیت های بلاد آگار در باز زمانیکه از اتاق استفاده نمی شود اما سیستم تهویه روشن است، آلودگی هوای اتاق را چک کنید.
۲- روش آسپتیک کاربران چک شود.
۳- درستی هود بررسی شود.
۴- منبع هوا و دستگاه های تهویه مطبوع چک شود.
۵- کیفیت تمیز بودن وسایلی که به آزمایشگاه وارد می شود چک شود.
۶- آیا کارهای ساختمانی یا کارهای مشابه دیگر در نزدیکی آزمایشگاه انجام می شود؟

در صورت وجود، تلاش کنید که آزمایشگاه کشت را تا حدامکان جدا کنید(مثلاً درها را بسته، پرده ها را کشیده، کارکنان غیر از کشت بافت را خارج کرده و همه تجهیزات و موادی که وارد اتاق می شود را تمیز کنید).

شناسایی نوع آلودگی

باکتریایی، قارچی

۱- با استفاده از میکروسکوپ فازکنتراست با بزرگنمایی بالا، سلولها یا محیط های کشت را از لحاظ آلودگی باکتریایی یا قارچی بررسی کنید.
۲- سلولها را در براث انکوبه کنید.
۳- سلولها را بر روی بلاد آگار کشت داده و کشت را انکوبه کنید.
۴- سلولها را رنگ آمیزی گرم نموده یا با یک میکروب شناس مشورت کنید.

میکوپلاسمایی

۱- کشت را با Hoechst 33258 رنگ کنید.
۲- با استفاده از اتورادیوگرافی، سنتز DNA سیتوپلاسمی (ترکیب شدن $[^3H]$- تیمیدین) را بررسی کنید.
۳- از تست تجاری استفاده کنید.

ویروسی

۱- آلودگی ویروسی را با استفاده از روش های زیر بررسی کنید :
a)میکروسکوپ الکترونی transmission یا scanning
b)رنگ کردن ایمنی (immunostaining) با یک آنتی بادی فلورسنت یا کانژوگه با پراکسیداز
c) آزمون های الیزا
d) PCR
۲- بدست آوردن رده های سلولی و معرف های بیولوژیکی از منابع فاقد ویروس

رفع آلودگی

۱- استوک ها را دور ریخته و در جهت رفع آلودگی از آنها تلاش نشود مگر این که استوک ها غیر قابل جایگزین باشند.
۲- فقط در مواردی که سلولها غیر قابل جایگزین کردن باشند برای رفع آلودگی تلاش شود.
a) این کار باید توسط یک فرد با تجربه صورت پذیرد.
b) در شرایط قرنطینه کار شود.

آلودگی شیمیایی

شیشه آلات

وجود پس مانده پس از تمیز کردن

۱- شیشه آلات کشت بافت را جدای از شیشه آلات مواد شیمیایی نگهداری کنید.
۲- مطمئن شوید که هیچ گونه پس مانده از آخرین شستشوی ظروف مخصوص مواد شیمیایی در ماشین شستشو باقی نمانده است.
۳- بررسی موضعی را توسط موارد زیر انجام دهید :
a) مشاهده چشمی
b) افزودن حجم کمی از BSS دارای فنل رد و مشاهده تغییر pH
c) افزودن حجم کمی از UPW و بررسی هدایت
d) کلونینگ سلولها بر روی شیشه بعد از استریلیزاسیون توسط حرارت خشک
۴- انتخاب دقیق دترژنت

تجمع گرد و غبار در طی ذخیره سازی

۱- همه ظروف در باز را با فویل بپوشانید.
۲- در محل یا ظرف بدون گرد و غبار ذخیره شوند.

پی پت ها

وجود پس مانده یا انسداد پی پت ها بعد از تمیز کردن

۱- مطمئن شوید که پی پت ها درحالی که سرآنها به سمت بالا می باشد، شستشو و خشک شده اند.
۲- پی پت ها را در داخل دترژنت جمع آوری کرده اما فقط در آب شستشو دهید.
۳- پی پت های شیشه ای را برای آگار استفاده نکنید.
۴- پی پت ها را بعد از شستشو و قبل از استریلیزاسیون چک کنید با :
a) مشاهده بینایی
b) افزودن حجم کمی از BSS دارای فنل رد و مشاهده تغییرات pH
c) افزودن حجم کمی از UPW و بررسی هدایت
۵- مطمئن شوید که توپی های پنبه ای قبل از شستشو خارج شده اند.

معرف های دیگر

آلودگی DMSO با پلاستیک حل شده از ظروف

۱- DMSO را در شیشه یا پروپیلن با در پوش شیشه ای یا پلی پروپیلنی ذخیره کنید.

۲- آن را با پی پت های شیشه ای یا سرسمپلرهای پلی پروپیلنی توزیع کنید.

فساد گلیسرول در هنگام ذخیره سازی طولانی مدت

۱- گلیسرول را در مقادیر کوچک خریداری کرده تا در عرض ۶-۳ ماه مصرف شود.

۲- در بطریهای تیره ذخیره شود.

پودرها و آئروسل ها

۱- مواد شیمیایی سمی که تولید گرد یا آئروسل می کنند را در هود شیمیایی دستکاری کنید.

۲- ترافیک افراد و وسایل را در داخل آزمایشگاه کشت بافت و نواحی آماده سازی کنترل کنید.

۳- قبل از ورود به آزمایشگاه کشت بافت روپوش آزمایشگاهی تمیز بپوشید.

کشت اولیه

راندمان پایین در کشت اولیه

اکسپلنت های اولیه نمی چسبند

۱- بستر را خراش دهید.

۲- اکسپلنت را برروی یک لامل قرار دهید.

۳- آن را در یک لخته پلاسما قرار دهید.

تفکیک ناکامل

۱-سلولها را با مدت زمان طولانی تر در پروتئاز قرار دهید.

۲- قبل از انکوباسیون از پیش تیمار سرد استفاده کنید.

۳- از یک پروتئاز دیگر یا پروتئاز اضافی استفاده کنید.

تفکیک کامل اما اتصال ضعیف

سلولهای شناور زنده می باشند

۱- بستر را تیمار کنید

a) پلاستیک را با کلاژن، فیبرونکتین، لامینین ، پلیD-لیزین یا پلی L-لیزین بپوشانید.

b) از یک لایه تغذیه کننده استفاده کنید.

۲- ممکن است غیر چسبنده باشد بنابراین در حالت سوسپانسیون کشت دهید.

اغلب سلولهای شناور مرده می باشند

۱- غلظت را بر حسب شمارش سلولهای زنده تنظیم کنید.

۲- سلولهای مرده را خارج کنید.

سلولهای شناور مرده بوده و تعداد کمی سلول چسبیده اند

دانسیته سلولی

دانسیته سلولی خیلی کم است؛ آن را افزایش داده تا به 1×10^{6} cells/mL برسد.

اتصال سلولی ضعیف است

بستر را تیمار کنید

آنزیم های مورد استفاده سمی می باشند

۱- از یک پروتئاز دیگر استفاده کنید.

۲- زمان مجاورت را کاهش دهید.

۳- قبل از انکوباسیون از پیش تیمار سرد با پروتئاز استفاده کنید.

محیط کشت خیلی اسیدی است

۱- محیط کشت را از لحاظ آلودگی چک کنید.

۲- غلظت سلولی را در زمان بذرافشانی یا ۲۴ ساعت بعد از آن کاهش دهید.

۳- بافر HEPES اضافه کرده و فلاسک را تهویه کنید(vent).

.

محیط کشت اشتباه

۱- تعدادی از محیط های کشت را آزمایش کنید.

۲- به مقالات رجوع کرده و محیط های کشت مناسب برای سلول مورد نظر را پیدا کنید.

تکمیل محیط کشت

۱- انواع مختلف یا بچ های متفاوتی از سرم را استفاده کنید.

۲- به جای سرم از محیط کشت فاقد سرم استفاده کنید.

۳- از فاکتورهای رشد مختلف استفاده کنید.

۴- از میتوژن های دیگر(از قبیل PMA ، پروستاگلاندین ها، هیدروکورتیزون یا استروئیدهای دیگر، هورمون های پپتیدی از قبیل انسولین و ترانسفرین) استفاده کنید.

۵- از محیط کشت شرطی شده استفاده کنید.

سلولهای اشتباهی انتخاب شده اند

رشد بیش از اندازه فیبروبلاست ها یا اندوتلیوم

۱- از محیط های کشت انتخابی استفاده کنید.

۲- از بسترهای انتخابی استفاده کنید.

۳- از یک لایه تغذیه کننده انتخابی استفاده کنید.

۴- از لحاظ آلودگی متقاطع از یک لایه تغذیه کننده یا یک میزبان گزنوگرافت چک شود.

آلودگی متقاطع با رده سلولی دیگر

در برابر رده های سلولی دیگر در حال کشت چک شود.

آلودگی

۱- از لحاظ آلودگی بررسی شود.

۲- بافت را با آنتی بیوتیک یا اتانول ٪۷۰ تیمار کنید.

۳- آلودگی را رفع کنید اما فقط زمانی که مواد غیرقابل جایگزین باشند.

تمایز

سلولها تمایز نمی یابند

۱- شرایط القاکننده تمایز به کار برده شود.
۲- از یک محیط کشت انتخابی در هنگام جداسازی و در طی تکثیر استفاده شود.
۳- با لایه تغذیه کننده مناسب به طور هم زمان کشت داده شود.

عدم تولید محصول

۱- بیان ژن مربوطه توسط RT-PCR یا تکنیک لکه گذاری نورترن (Northern blot) یا دورگه سازی insitu (insitu hybridization) بررسی شود.
۲- بیان ژن گزارشگر (توسط RT-PCR یا تکنیک لکه گذاری نورترن) بررسی شود.
۳- شرایط القاء کننده تمایز به کار برده شود.
۴- از محیط کشت انتخابی مناسب برای آن نوع سلول در طی جداسازی و تکثیر استفاده شود.

غذا دهی

تک لایه های منظم

pH سریع کاهش می یابد

۱- از لحاظ آلودگی باکتریایی چک شود.
۲- تعداد دفعات بیشتری غذا دهی شود.
۳- در غلظت سلولی پایین تری بذرافشانی شود.
۴- به محیط کشت بافر HEPES اضافه شود.

بعد از غذا دهی pH افزایش می یابد

۱- بی کربنات یا بازهای دیگر در محیط کشت را کاهش دهید.
۲- غلظت CO_2 را افزایش دهید.
۳- فلاسک های انکوبه شده در هوا را از لحاظ نشتی و یا وقتی که در انکوباتور CO_2 انکوبه می شوند از لحاظ وجود لایه نازک مایع که باعث مسدود شدن درپوش ها می شود، بررسی کنید.

کلون ها

دیش ها آلوده شده اند

۱- دیش ها را در جعبه انکوبه کرده و قبل از باز کردن جعبه ها آنها را سواب کنید.
۲- درپوش های دیش ها یا پلیت ها را مخصوصاً زمانی که در آنها محیط کشت وجود دارد، دور بریزید. سطح خارجی پایه را با الکل ٪۷۰ سواب کنید.
۳- در انکوباتور از فن استفاده نکنید.

به غذا دهی نیاز می باشد

تک لایه

محیط کشت را تعویض کنید.

سوسپانسیون

۱- محیط کشت را به کشت های آگار اضافه کنید.
۲- محیط کشت به اضافه متوسل را به کلون های متوسل اضافه کنید؛ مواد غذایی از طریق متوسل انتشار خواهند یافت.

واکشت

این قسمت در مورد مشکل راندمان پایین یا رشد آهسته بعد از واکشت بحث می کند.

فاز چرخه سلولی در واکشت

۱- از مرحله نمایی یا انتهای مرحله نمایی(-late exponential phase) واکشت دهید.
۲- مطمئن شوید که غلظت بذرافشانی درست می باشد- غلظت خیلی کم باعث می شود که سلولها یک دوره تاخیر طولانی داشته و غلظت خیلی زیاد باعث می شود قبل از این که واکشت شوند وارد مرحله سکون شوند.
۳- از مرحله سکون واکشت ندهید زیرا سلولهای مرحله سکون تمایل به داشتن یک مرحله تاخیر طولانی دارند. بعضی از کشت ها از قبیل هیبریدوماها و لوکمیاهای موشی در مرحله سکون سریع رو به زوال می روند.
۴- بیش از مقدار نیاز واکشت ندهید. یک غلظت سلولی را انتخاب کرده و براساس آن واکشت دهید.

پیری

۱- شماره نسل را چک کنید؛ سلولها ممکن است به انتهای دوره عمر محدود خود نزدیک شده باشند.
۲- استوک ها را از فریزر جایگزین کنید.
۳- در صورت نیاز جاودان سازی را انجام دهید.

محیط کشت

همانند رشد سلولی آهسته

رشد ناهموار

توزیع غیر تصادفی سلولها

همانند کلونینگ

بذرافشانی نادرست

۱- در هنگام پی پتینگ باعث چرخیده شدن سوسپانسیون سلولی نشوید.
۲- سلولها را بدون مخلوط کردن در وسط دیش پی پت نکنید.

۳- دیش را برای مخلوط کردن سلولها نچرخانید، بلکه آن را به چپ و راست و عقب و جلو حرکت داده یا بدون چرخاندن، آهسته به بالا و پایین پی پت کنید.

لرزش انکوباتور

۱- تعداد دفعات دسترسی به انکوباتور را محدود کنید.
۲- چک کنید که انکوباتور به صورت محکم قرار گرفته است.
۳- مطمئن شوید که قفسه ها تراز می باشند.
۴- یک بالشتک(cushion) در زیر فلاسک ها، دیش ها یا پلیت ها قرار دهید.

گرمایش نامساوی

۱- فلاسک ها یا دیش ها را روی یک آجر عایق یا صفحه فلزی قرار دهید.
۲- توزیع هوا و درجه حرارت را چک کنید.

کلونینگ

به رشد سلولی آهسته در همین فصل رجوع شود.

کارایی پلیتینگ ضعیف

تعداد بسیار کمی کلنی در هر دیش

۱- غلظت بذرافشانی را افزایش دهید.
۲- از یک لایه تغذیه کننده استفاده کنید.
۳- کارایی پلیتینگ را بهبود دهید.

کلنی ها خیلی پراکنده می باشند

۱- از یک پتری دیش بزرگتر استفاده کرده تا فضای بیشتری را برای انتشار کلنی ها فراهم سازد.
۲- از گلوکوکورتیکوئید استفاده کنید (مثلاً دگزامتازون M 1×10^{-6}–1×10^{-5})

آلودگی میکوپلاسمایی

۱- از لحاظ میکوپلاسما غربالگری کنید.
۲- در صورتی که رده سلولی غیرقابل جایگزین می باشد به عنوان راه حل آخر برای رفع آلودگی میکوپلاسمایی تلاش شود.

دستکاری نامناسب

۱- آیا سلولها مدت زمان زیادی خارج از انکوباتور بوده اند؟
۲- آیا مدت زمان زیادی برای رقیق سازی صرف شده است؟
۳- آیا محیط کشت در طی انکوباسیون تبخیر شده است؟

محیط کشت

نوع

۱- یک محیط کشت غنی (مثل Ham's F12) را انتخاب کنید.
۲- اگر محیط کشت فاقد سرم می باشد (مثلاً MCDB 153 برای کراتینوسیت ها) محیط کشت فاقد سرم دیگر را آزمایش کنید.

۳- CO_2 ضروری می باشد، بنابراین همیشه در حداقل CO_2 ۲٪ انکوبه کنید.
۴- با وزن کردن دیش های مورد آزمایش با محیط کشت وتحت شرایط یکسان در آغاز و در طی دوره کشت آنها را از نظر تبخیر چک کنید.

اگر سرم ضروری می باشد

۱- از سرم جنین گاو (FBS) استفاده کنید که معمولاً برای کلونینگ بهتر از سرم گوساله یا اسب می باشد.
۲- در صورتی که از سرم جنین گاو استفاده کرده اید، غلظت آن را افزایش دهید.
۳- بچ را براساس کارایی پلیتینگ سلولهایی که استفاده می کنید انتخاب نمایید.

بستر نامناسب

آیا تغییری در شرکت سازنده وسایل پلاستیکی صورت گرفته است؟

۱- منبع وسایل پلاستیکی را چک کرده و در صورت نیاز آن را تغییر دهید.
۲- استفاده از پلاستیک های باردار مثل (BD Biosciences) Primaria یا CellBIND(Corning) را آزمایش کنید.
۳- پلاستیک را با ماتریکس بپوشانید.

کلنی های پراکنده

۱- با ماتریکس بپوشانید.
۲-برای ۷۲-۴۸ ساعت اول از گلوکوکورتیکوئید (مثلاً دگزامتازون M 1×10^{-5}–1×10^{-7}) استفاده کنید.
۳-از یک لایه تغذیه کننده استفاده کنید.

تعداد بسیار زیادی کلنی در هر دیش

۱- غلظت بذر افشانی (cells/mL) را کاهش دهید.
۲- تعداد مشابهی از سلولها را در یک دیش بزرگتر بذرافشانی کنید.

کلنی های روی هم افتاده

۱- دانسیته بذر افشانی($cells/cm^2$) را کاهش دهید.
۲- کلنی ها را برای زمان کوتاهتری رشد دهید (سلولهای کمتر در هر کلنی).
۳- تعداد مشابهی از سلولها را در یک دیش بزرگتر بذرافشانی کنید.

توزیع غیر تصادفی

۱- سلولها را به محیط کشت در یک بطری افزوده، سوسپانسیون سلولی را مخلوط کرده و سپس دیش ها را بذرافشانی کنید.

۲- برای مخلوط کردن سلولها یا وقتی که پی پتینگ مـی کنیـد، دیش ها را نچرخانید.
۳- مطمئن شوید که دیش ها تراز می باشند.
۴- مطمئن شوید که محیط کشت، همه تـه دیـش را بـه طـور هموار می پوشاند.
۵- مطمئن شوید که انکوباتور فاقد لرزش می باشد.
۶- دسترسی افراد دیگر را به انکوباتور محدود کنید.
۷- عبارت « کلونینگ، جا به جـا نکنیـد» را بـر روی جعبـه یـا سینی حاوی دیش ها بنویسید.
۸- جعبه یا سینی را در عقب انکوباتور قرار دهید.
۹- جعبه یا سینی حاوی دیـش هـا را بـر روی یـک فـوم قـرار دهید(این بالشتک فوم را مرتب شستشو دهید).

سلولهای غیر چسبنده

سلولهای مستقل از تکیه گـاه (anchorage- independent cells)
۱- سلولها را در آگار، آگارز یا متوسل روی یک لایه آگار یا در یک دیش که از نوع کشت بافت نمی باشد، کلون کنید.
۲- فاکتورهای رشد یا مکمل ها را به لایه زیرین اضافه کنید.
۳- از دیش های از نوع کـشت بافـت اسـتفاده کـرده و قبـل از ریختن لایه زیرین، لایه تغذیه کننده را بذرافشانی کنید.

سلولهایی که به طور سست چسبیده اند

سلولها را در متوسل در یک دیش از نوع کـشت بافـت کلـون کنید.

آلودگی متقاطع

این قسمت در مورد مشکل آلودگی متقاطع با رده سلولی دیگر بحث می کند.

علایم آلودگی متقاطع

تغییر در ظاهر

ریخت سلولها تغییر می کند: سلولها در دانسیته بالا در مرحله سکون وقتی که به طور طبیعی ممانعت تماسـی مـی شـوند بـه صورت توده در می آیند.

تغییر در خصوصیات رشد

میزان رشد سریعتر (یعنی PDT کوتاهتر).
سلولها تا دانسیته اشباع بالاتری رشد می کنند.

مشخصات رده سلولی

تغییر در خصوصیات فنوتیپی

جلوگیری از آلودگی متقاطع

۱- معرف های خود را با افراد دیگر به اشتراک نگذارید.
۲- معرف ها را در میان رده های سلولی به اشتراک نگذارید.
۳- در یک زمان با بیش از یک رده سلولی کار نکنید.
۴- بعد از استفاده از یک پی پت برای سـلولها آنـرا بـه محـیط کشت باز نگردانید.
۵- بـرای تکثیـر سـریال از سـمپلر اسـتفاده نکنیـد مگـر اینکـه سر سمپلرهای فیلتر دار استفاده شود.
۶- با سـلولهای HeLa و دیگـر سـلولهای تنـد رشـد و دارای کارایی پلیتینگ بالا در انتها کار شود.
۷- قبل از منجمد کردن سلولها، آنها را تایید کنید.

حذف آلودگی متقاطع

۱- کشت را دور بریزید.
۲- اگـر زود تـشخیص داده شـد (یعنـی شـواهدی از کـشت مخلوط وجود داشت) و استوک دیگری هـم موجـود نبـود، سلولها را کلون کرده و کلنی های احتمالی را جدا کنید.
۳- یـک مرتـب سـازی مثبـت یـا منفـی توسـط FACS یـا MACS انجام دهید.

منجمدنگهداری

باز یافت ناچیز

میزان منجمد کردن

۱- میزان سرد کردن را تغییر دهیـد. میـزان ۱°C/min معمـولاً بهینه می باشد.
a) در صورت اسـتفاده از ظـرف عـایق بنـدی شـده، ضـخامت دیواره را تغییر دهید.
b) از فریزر قابل برنامه ریزی استفاده کـرده تـا میـزان و شـکل منحنی سرد کنندگی تغییر کند.

غلظت سلولی

در منجمد کردن

در هنگام منجمد کردن غلظت سلولی را افزایش دهید (معمـولاً مقدار بهینه از 1×10^{6}-1×10^{7} cells/mL می باشد).

ذوب کردن و بذرافشانی مجدد

۱- بعد از ذوب کردن بـا افـزودن تـدریجی محـیط کـشت بـه سلولها کشت را بسیار آهسته رقیق کنید.
۲- سلولها را با دانسیته پنج برابـر دانـسیته بذرافـشانی طبیعـی بذرافشانی کنید.
۳- چندین آمپول را با هم مخلوط کنید(برای خارج کردن ماده محافظ به سانتریفوژ کردن نیاز خواهد بود).
۴- سلولهای مرده را خارج کنید.

ماده محافظ

DMSO

۱- آلودگی شیمیایی در DMSO چک شود (از پلاسـتیک یـا لاستیک).
a) رنگ آنرا چک کنید؛ باید بی رنگ باشد.

b) در صورتیکه بی رنگ بود، یک اسکن اسپکتروفتومتری انجام داده و با DMSO تازه مقایسه شود.
۲- چک شود که آیا سلولها نسبت به القاء تمایز توسط DMSO حساس می باشند.
۳- سلولهایی که به صورت شناور رشد می کنند را سانتریفوژ کرده تا ماده محافظ جدا شود.

گلیسرول

اگر گلیسرول به مدت چند ماه در مجاورت نور نگهداری شود سمی می شود (گلیسرول به آکرولئین تبدیل می شود).
۱- گلیسرول را در مقادیر کوچک توزیع کنید.
۲- گلیسرول را در تاریکی ذخیره کنید.

ظاهر تغییر یافته پس از منجمد نگهداری

هویت اشتباهی

۱- برچسب آمپول را چک کنید. اگر بر چسب ناخوانا بود، آمپول را دور بیاندازید.
۲- اسناد را چک کنید.
۳- اعتبار آنها را چک کنید.

شرایط تغییر یافته از زمانی که سلولها برای آخرین بار رشد داده شده اند
۱) آیا کارکنان جدیدی اضافه شده اند؟
۲) آیا روش های جدیدی وجود دارد؟
۳) آیا شرکت سازنده محیط های کشت تغییر یافته است؟
۴) آیا از یک بچ سرم جدید استفاده شده است؟

آلودگی

نشتی آمپول

زهوار را چک کنید : درپوش باید محکم باشد اما زهوار (seal) نباید خمیده شده باشد.

آلودگی از حمام آب در هنگام ذوب کردن

۱- آمپول ها را در آب شناور نکنید. آنها را در یک رک قرار داده به طوریکه فقط قسمتی از آنها در آب غوطه ور شود.
۲- آمپول ها را در یک بلاک گرم کننده (heating block) ذوب کنید.
۳- بعد از ذوب کردن آمپول ها را با دقت سواب کنید.

نکته ایمنی) به خاطر داشته باشید اگر آمپول ها در نیتروژن مایع ذخیره شده باشند ممکن است در هنگام ذوب کردن منفجر شوند، بنابراین در هنگام ذوب کردن آنها را در یک رک قرار داده و آنها را بپوشانید.

آلودگی از نیتروژن مایع

آمپول ها را در نیتروژن مایع غوطه ور نکنید. برای ذخیره سازی از فاز بخار یا از یک فریزر perfused jacket استفاده کنید.

اتلاف استوک

استوک مصرف کننده

از استوک توزیع مجدداً استوک تهیه کنید.

استوک توزیع

از استوک بذرافشانی استوک تهیه کنید.

اتلاف استوک بذرافشانی
۱- امنیت صورت موجودی را چک کنید؛ باید محدود به شخص مسئول باشد.
۲- از یک بانک سلولی معتبر مجدداً استوک تهیه کنید.

دانه دار بودن سلولها

داخل سلولی

آیا سلولها ناسالم می باشند؟

۱- منحنی رشد را چک کنید.
۲- کارایی پلیتینگ را چک کنید.

آیا میزان زیادی فاگوسیتوز وجود دارد؟
با میکروسکوپ با بزرگنمایی بالا جذب قرمز خنثی (neutral red) یا دکستران فلورسنت را چک کنید.

خارج سلولی

ذرات با اندازه یکنواخت

از لحاظ آلودگی چک شود.

ذرات با اندازه متغیر

۱- ته نشین محیط کشت چک شود.
۲- آیا رسوب گذاری مربوط به سرم می باشد(معمولاً مضر نمی باشد)؟

شمارش سلولی

هموسیتومتر

شمارش های متغیر

خطا در نمونه برداری

۱- سوسپانسیون سلولی را قبل از نمونه برداری به طور کامل مخلوط کنید.
۲-سلولها باید به صورت تکی بوده و به صورت توده نباشند.

استفاده از هموسیتومتر

۱- مطمئن شوید که لامل درست چسبیده است (رنگ های تداخلی باید دیده شوند).
۲- مطمئن شوید که محفظه شمارش بیش از حد یا کمتر از حد پر نشده است.
۳- تعداد کافی از سلولها باید شمارش شوند(بیش از ۲۰۰).

قابلیت دید سلولها

۱- سطح نقره ای بر روی محفظه شمارش باید سالم باشد.
۲- از عدسی های فاز کنتراست استفاده کنید.

۳- اگر عدسی های فاز کنتراست در دسترس نبود از یک مسیر نور غیر متمرکز(noncentered light path) استفاده کنید.
۴- قبل از شمارش سلولها، آنها را رنگ کنید.

شمارش الکترونیک از طریق روزنه توسط مقاومت

شمارش های متغیر

خطا در نمونه برداری

۱- سوسپانسیون سلولی را قبل از نمونه برداری کاملاً مخلوط کنید.
۲- سلولها باید به صورت تکی بوده و به صورت توده ای نباشند.

شمارش متوقف شده، شروع نشده یا آهسته شمارش می شود(یعنی بیش از ۲۵ ثانیه طول می کشد)

روزنه یا کانال سلولی مسدود شده است

۱- چرخه شستشو را ادامه دهید.
۲- چرخه مسدود نشده را ادامه دهید.
۳- روزنه را با نوک انگشت یا با یک برس نرم پاک کنید.
۴- به مدت ۱۸-۱ ساعت در دترژنت خیسانده و چرخه شستشو را سه مرتبه تکرار کنید.

شمارش کمتر از مقدار مورد انتظار بوده یا روزنه مرتب مسدود می شود

سوسپانسیون سلولی به صورت توده در آمده است

۱- با پی پتینگ کردن شدید نمونه اولیه سلولها را پراکنده کرده، نمونه را دوباره رقیق کرده و سپس شمارش را انجام دهید.
۲- از یک تکنیک تفکیک متفاوت استفاده کنید.

زمینه بالاست اما شمارش نمی شود

الکترود خارج از بشر بوده یا قطع شده است

۱- الکترود را در داخل بشر قرار دهید.
۲- چک کنید که الکترود محکم باشد.
۳- اگر صفحه انتهایی از دست رفته است الکترود را تعویض کنید.

مرحله شمارش شروع نخواهد شد

روزنه مسدود

۱- چرخه شستشو را ادامه دهید.
۲- چرخه های مسدود نشده را ادامه دهید.
۳- روزنه را با نوک انگشت یا با یک برس نرم پاک کنید.
۴- به مدت ۱۸-۱ ساعت در دترژنت خیسانده، چرخه مسدود نشده و شستشو را سه بار دیگر تکرار کنید.

فشار منفی ناکافی

۱- مخزن مواد زائد را چک کرده که پر نباشد.
۲- پمپ و اتصالات را چک کنید.
۳- در صورت خرابی پمپ با مهندس تعمیرات تماس بگیرید.

تجهیزات الکتریکی(موتورها، لامپ های فلورسنت، انکوباتورها) مشکل دارند.

۱- مشکلات بالقوه را چک کرده و رفع کنید.
۲- اتصال دستگاه شمارشگر را با زمین چک کنید.

وجود ذرات ریز در مایع شمارش

۱- مایع شمارش تازه تهیه کنید.
۲- مایع شمارش را با یک Millex یک بار مصرف یا فیلتر مشابه صاف کنید.

زیستایی

ظاهر ریخت شناسی

دانه دار بودن و وجود حفره (granularity and vacuolation)

معمولاً وجود دانه های داخل سلولی نشاندهنده این است که سلولها ناسالم می باشند.
معمولاً وجود حفره نشاندهنده این است که سلولها ناسالم می باشند.

فقدان انکسار مضاف(birefringence)

سلولهای تک لایه

اگر سلولها به طور طبیعی دارای انکسار باشند(لبه سلولها در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست دارای یک هاله باشد) اما انکسار خود را مثلاً با خشک شدن در طی غذا دهی از دست بدهند، معمولاً سلولها زیستایی خود را از دست داده اند.

سلولهای سوسپانسیون

سلولهای سوسپانسیون معمولاً شفاف می باشند، وجود ظاهر دانه دار یا کدر مشخص کننده سلولها مرده یا غیر سالم می باشد.

خارج کردن سلولهای مرده غیر قابل رشد

۱- محیط کشت را تعویض کنید. سلولهای تک لایه اگر غیر قابل رشد باشند شناور خواهند شد و بنابراین برای خارج کردن آنها به دستور العمل خاصی نیاز نمی باشد.
۲- برای سلولهای سوسپانسیون یا سلولهای تفکیک شده اولیه، سلولهای زیستا را با اسپین کردن آنها در Ficoll- Paque غنی کنید.

آزمایش زیستایی

اگر بعد از دستکاری، از دست رفتن سریع سلولها اتفاق افتد، آن را با روش ممانعت از جذب رنگ یا روش جذب رنگ بررسی کنید.

a) کشت های اولیه معمولاً ٪۹۰-۵۰ زیستا می باشند.
b) رده های سلولی معمولاً ٪۱۰۰-۹۰ زیستا می باشند.
c) سلولهای ذوب شده معمولاً ٪۸۰-۵۰ زیستا می باشند.

سیتوتوکسیسیتی

در صورتی که زوال سلولها مدت زمان زیادی طول کشیده است، علت های احتمالی آن را با آزمون کلونوژنیک یا میکروتیتراسیون بررسی کنید.

پیوست ۱

تهیه معرف ها

این پیوست شامل معرف هایی است که در چندین دستور کار مختلف در کل کتاب استفاده می شوند. معرف های اختصاصی که فقط در یک دستور کار استفاده می شوند معمولاً در داخل قسمت مواد همان دستور کار آورده شده اند.

نکته) رقت هایی که به عنوان مثال به صورت ۱:۱۰ یا ۱:۱۰۰ مشخص شده اند به صورت v/v می باشند و نشان دهنده این است که حجم نهایی به ترتیب ۱۰ یا ۱۰۰ قسمت می باشد.

Acetic/ Methanol

یک قسمت اسید استیک گلاسیال به ۳ قسمت متانول اضافه شود. در هر بار استفاده به صورت تازه تهیه شده و بر روی یخ نگهداری شود.

Agar 2.5%

آگار .... ۲/۵ g
UPW .... ۱۰۰ mL

۱) جوشانده تا آگار حل شود.
۲) با اتوکلاو کردن یا جوشاندن به مدت ۲ دقیقه استریل شود.
۳) در درجه حرارت اتاق نگهداری شود.

Amido Black

به نفتالن بلک رجوع شود.

Amino Acids, Essential

(به صورت غلظت ×۵۰ در HCl ۰/۱M از شرکت های تجاری از قبیل Invitrogen، MP Biomedicals و Sigma موجود می باشد.)

۱) تیروزین و تریپتوفان را در غلظت ×۵۰ در HCl ۰/۱M و اسیدهای آمینه دیگر را در غلظت × ۱۰۰ در آب خالص با هم ترکیب کنید.
۲) برای استفاده همانند دستور کار آن را رقیق کنید.
۳) با فیلتراسیون آن را استریل کنید.
۴) در دمای ۴°C در تاریکی نگهداری شود.

Amino Acids- Nonessential

اجزاء سازنده	g/L (۱۰۰×)
L- آلانین	۰/۸۹
L- آسپاراژین H_2O	۱/۵۰
L- آسپارتیک اسید	۱/۳۳
گلیسین	۰/۷۵
L- گلوتامیک اسید	۱/۴۷
L- پرولین	۱/۱۵
L- سرین	۱/۰۵
آب	۱۰۰۰mL

۱) با فیلتراسیون استریل شود.
۲) در دمای ۴°C نگهداری شود.
۳) در غلظت ۱:۱۰۰ استفاده شود.

Antibiotics

به عنوان اختصاصی هر آنتی بیوتیک رجوع شود (مثلاً پنی سیلین، سولفات استرپتومایسین، سولفات کانامایسین، جنتامایسین، میکوستاتین).

Antifoam

مثل RD امولسیون ۹۹۶۴/۴۰

۱) در مقادیر کم توزیع کرده و با اتوکلاو کردن استریل کنید.

۲) در درجه حرارت اتاق ذخیره سازی شود.
۳) تا ۰/۱ mL/L رقیق کنید (یعنی ۱:۱۰۰۰۰).

Bactopeptone 5%

باکتوپپتون Difco 5g

Hanks' BSS ۱۰۰mL

۱) همزده تا حل شود.
۲) در مقادیر مناسب برای استفاده به صورت رقت ۱:۵۰ توزیع شده و اتوکلاو گردد.
۳) در درجه حرارت اتاق ذخیره سازی شود.
۴) برای استفاده به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق شود.

Balanced Salt Solutions(BSS)

۱) هر جزء سازنده را به صورت مجزا حل کرده و $CaCl_2$ را در انتها اضافه کنید.
۲) تا حجم ۱ L برسانید.
۳) pH را تا ۶/۵ تنظیم کنید.
۴) محلول را با اتوکلاو کردن یا فیلتراسیون استریل کنید. در هنگام اتوکلاو کردن باید pH زیر ۶/۵ نگداشته شود تا از رسوب کردن فسفات کلسیم جلوگیری شود. همچنین می توان کلسیم را حذف کرد و در انتها اضافه کرد. در صورت وجود گلوکز، برای جلوگیری از سوختن گلوکز محلول باید فیلتر شود یا گلوکز را به صورت مجزا (گلوکز ٪۲۰ در همین پیوست رجوع شود) در غلظت بالاتر (مثلاً ٪۲۰) اتوکلاو کرده و بعداً آن را اضافه کرد.
۵) در مورد اتوکلاو کردن، سطح مایع را قبل از اتوکلاو کردن علامت بگذارید. محلول را در درجه حرارت اتاق ذخیره کنید و در صورت تبخیر، قبل از استفاده، با آب استریل خالص به حجم اولیه برسانید. در صورت استفاده از شیشه بروسیلیکات، قبل از اتوکلاو کردن می توان در بطری را محکم بست تا هیچگونه تبخیری صورت نپذیرد.

Bufferd glycerol mountant

به میکوپلاسما رجوع شود.

Carboxymethylcellulose (CMC)

۱) ۴ g از CMC را وزن کرده و در یک بشر بریزید.
۲) ۹۰ mL از Hanks' BSS به آن افزوده و مخلوط را بجوشانید.
۳) محلول را به مدت یک شب در دمای ۴°C قرار داده تا صاف شود.
۴) توسط Hanks' BSS حجم را به ۱۰۰ mL برسانید.
۵) محلول را با اتوکلاو کردن استریل کنید. CMC مجدداً سفت خواهد شد اما در دمای ۴°C دوباره حل خواهد شد.
۶) برای استفاده (مثلاً برای افزایش ویسکوزیته محیط کشت در کشت های سوسپانسیون) ۳ mL به ازای هر ۱۰۰mL محیط کشت رشد استفاده کنید.

Chick Embryo Extract

۱) جنین ها را از تخم مرغ ها خارج کرده و آنها را در پتری دیش های ۹cm قرار دهید.
۲) با استفاده از دو جفت پنس استریل چشم ها را خارج کنید.
۳) جنین ها را به ظروف ۵۰ mL ته صاف یا ته گرد (در هر ظرف دو جنین) انتقال دهید.
۴) یک حجم مساوی Hanks' BSS به هر ظرف اضافه کنید.
۵) با استفاده از یک میله شیشه ای که قبلاً یک انتهای آن با حرارت مسطح شده است، جنین ها را در BSS خرد کنید.
۶) اجازه دهید که مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق باقی بماند.
۷) مخلوط را به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ g سانتریفوژ کنید.
۸) سوپرناتانت را خارج کرده و پس از نگهداری یک نمونه برای بررسی استریلیتی آن، محلول را در مقادیر کوچک توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- نگهداری کنید.

عصاره های جوجه و بافت های دیگر را می توان همچنین با هموژنیزاسیون در یک هموژنایزر یا مخلوط کن تهیه کرد.

۱) جنین های خرد شده را در یک حجم مساوی از Hanks' BSS هموژن کنید.
۲) جنین های هموژن شده را به لوله های سانتریفوژ انتقال داده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰g سانتریفوژ کنید.
۳) سوپرناتانت را به لوله های جدید انتقال داده و به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در ۱۰۰۰ g سانتریفوژ کنید.
۴) نمونه را از لحاظ استریل بودن بررسی کنید.
۵) در مقادیر کوچک توزیع کنید.
۶) در دمای ۲۰°C- ذخیره سازی نمایید.

Citric Acid/ Crystal Violet

به کریستال ویوله رجوع شود.

CMC

به کربوکسی متیل سلولز رجوع شود.

Colcemid 100 × Concentrate

کلسمید ۱۰۰mg
Hanks' BSS ۱۰۰mL
۱) هم زده تا حل شود.
۲) توسط فیلتراسیون استریل شود.
۳) در مقادیر کوچک توزیع شده و در دمای ۲۰°C- ذخیره سازی شود.

نکته ایمنی) کلسمید سمی است، با احتیاط دستکاری شود و در یک هود شیمیایی وزن شود و در موقع کار با آن دستکش پوشیده شود.

Collagenase

۲۰۰۰ U/mL در Hanks' BSS

کلاژناز Worthington CLS- grade یا معادل آن (فعالیت مخصوص ۱۵۰۰-۲۰۰۰ U/mg) ۱۰۰۰۰۰ U
Hanks' BSS ۵۰mL
۱) برای حل کردن مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C یا یک شب در دمای ۴°C همزده شود.
۲) همانند سرم، محلول با فیلتراسیون استریل شود.
۳) در مقادیر کوچک هر کدام برای استفاده ۲-۱ هفته توزیع شود.
۴) در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

Collagenase- Trypsin- Chicken serum (CTC)

سالین بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} ۸۵mL
استوک تریپسین ٪۲/۵ استریل ۴mL............................٪۰/۱
استوک کلاژناز ٪۱ استریل ۱۰mL............................٪۰/۱
سرم جوجه ۱mL..٪۱
در مقادیر کوچک توزیع کرده و در دمای ۲۰ °C- ذخیره شود.

Collection Medium (for Tissue Biopsies)

محیط کشت رشد ۵۰۰ mL
پنی سیلین ۱۲۵۰۰۰ U
استرپتومایسین ۱۲۵mg
کانامایسین ۵۰mg
یا
جنتامایسین ۲۵mg
آمفوتریسین ۱/۲۵mg
در دمای ۴°C به مدت ۳ هفته یا در دمای ۲۰°C- برای زمان های طولانی تر ذخیره شود.

Crystal Violet 0.1% in 0.1M Citric Acid

اسید سیتریک ۲۱g
کریستال ویوله ۱g
۱) با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰۰ mL رسانده شود.
۲) همزده تا حل شود.
۳) برای شفاف شدن، محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره۱ صاف کنید.

Crystal Violet 0.1% in Water

کریستال ویوله ۱۰۰mg
آب ۱۰۰mL
قبل از استفاده با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شود.
محلول آماده آن از شرکت Merck موجود می باشد.

Dexamethasone (Merck)

۱mg/mL (۱۰۰×)
این معرف در ویال های شیشه ای استریل وجود دارد.
۱) برای حل کردن، ۵ mL آب را با سرنگ به ویال اضافه کنید.
۲) وقتی که حل شد آن را خارج کنید.
۳) تا غلظت ۱ mg/mL حدود ۲/۵ mM رقیق کنید.
۴) محلول را در مقادیر کوچک توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- ذخیره کنید.
۵) برای استفاده، محلول را رقیق کرده تا به غلظت ۱-۵۰nM (محدوده غلظت فیزیولوژیکی)، ۲۵-۱۰۰ μM (محدوده دوز بالا) برسد.

β-متازون و متیل پردنیزولون را می توان به همین روش تهیه کرد.

Dissection BSS (DBSS)

۱) به Hanks' BSS بدون بیکربنات که قبلاً با اتوکلاو کردن استریل شده است مواد زیر را اضافه کنید (همگی استریل می باشند):
پنی سیلین ۲۵۰U/mL
استرپتومایسین ۲۵۰μg/mL
کانامایسین ۱۰۰ μg/mL
یا
جنتامایسین ۵۰μg/mL
آمفوتریسین B ۲/۵μg/mL
۲) در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

EDTA (Versene)

۱) به صورت محلول غلیظ ۱۰mM، ۰/۳۷۴ g/L در D-PBSA تهیه شود.
۲) با اتوکلاو کردن یا فیلتراسیون استریل شود.
۳) برای استفاده در غلظت ۲-۱ mM به نسبت ۱:۱۰ یا ۱:۵ رقیق شود یا استثنائاً برای استفاده در غلظت ۵mM به

نسبت ۱:۲ در D-PBSA یا ترپیسین در D-PBSA رقیق شود.

EGTA

همانند EDTA اما به دلیل سمیت کمتر EGTA را می توان در غلظت های بالاتر استفاده کرد.

Ficoll 20%

۱) ۲۰g از Ficoll را بر روی سطح ۸۰mL آب UPW بپاشید.
۲) اجازه داده تا به مدت یک شب ته نشین و حل شود.
۳) با آب UPW به حجم ۱۰۰mL رسانده شود.
۴) با اتوکلاو کردن استریل شود.
۵) در درجه حرارت اتاق ذخیره شود.

Fixative for Tissue Culture

به استیک/ متانول رجوع شود.

در روش دیگر از متانول یا اتانول خالص بدون آب ، فرمالین ٪۱۰، گلوتاراآلید ٪۱ یا پارافرمالدئید ٪۵ استفاده شود.

Gentamycin

برای استفاده تا غلظت ۵۰µg/mL رقیق شود.

Gey's Balanced Salt Solution

NaCl	۷g
KCl	۰/۳۷g
$CaCl_2$	۰/۱۷g
$MgCl_2.6H_2O$	۰/۲۱g
$MgSO_4.7H_2O$	۰/۰۷g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	۰/۳g
KH_2PO_4	۰/۰۳g
$NaHCO_3$	۲/۲۷g
گلوکز	۱g
آب	۱۰۰۰ml
CO_2	٪۵

Giemsa Stain

رنگ گیمسا را می توان به صورت رقیق نشده به کار برد و سپس با بافر یا آب رقیق کرد یا قبل از استفاده در بافر رقیق نمود. برای سلولهای کشت یافته روش اول موفقیت آمیزتر می باشد.

۱) تهیه بافر:

$NaH_2PO_4.2H_2O$	۰/۰۱ M	۱/۳۸ g/L
$Na_2HPO_4.7H_2O$	۰/۰۱ M	۲/۶۸ g/L

مخلوط کرده تا به ۶/۵ pH برسد.

۲) محلول غلیظ گیمسا تهیه شده را به نسبت ۱:۱۰ در ۱۰۰mL بافر رقیق کنید.
۳) محلول را با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف کرده تا شفاف شود.
۴) هر دفعه یک محلول تازه تهیه کنید زیرا محلول غلیظ در هنگام ذخیره سازی رسوب می کند.

Glucose 20%

گلوکز۲۰g
۱۰۰mLHanks' BSS
۱) با اتوکلاو کردن استریل کنید.
۲) در درجه حرارت اتاق ذخیره شود.

Glutamine 200mM

L- گلوتامین۲۹/۲g
۱۰۰۰mLHanks' BSS
۱) گلوتامین را در BSS حل کرده و با فیلتراسیون استریل کنید.
۲) محلول را در مقادیر کوچک توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- ذخیره کنید.

Glutathione

۱) استوک ۱۰۰× را تهیه کرده (یعنی غلظت ۰/۱M در HBSS یاD-PBSA) و برای استفاده تا ۱mM رقیق شود.
۲) با فیلتراسیون استریل شود.
۳) در مقادیر کوچک توزیع شده و در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

Ham's F12

به جدول ۳-۶ رجوع شود.

Hanks' BSS

به مبحث محلولهای نمکی متعادل شده در فصل ۶ و در همین ضمیمه رجوع شود.

HAT Medium

دارو	غلظت	حل شود در	مولاریتی(نهایی ×۱۰۰)
هیپوگزانتین (H)	۱۳۶mg/۱۰۰mL	۰/۰۵N HCL	$۱×۱۰^{-۲}$M
آمینوپترین (A)	۱/۷۶mg/۱۰۰mL	۰/۱N NaOH	$۴×۱۰^{-۵}$M
تیمیدین (T)	۳۸/۷mg/۱۰۰mL	HBSS	$۱/۶×۱۰^{-۳}$ M

۱) برای استفاده در محیط کشت انتخابی HAT، حجم های مساوی از هر کدام را مخلوط کرده و با فیلتراسیون مخلوط را به نسبت ٪۳ v/v به محیط کشت اضافه کنید.

۲) H و T را در دمای ۴°C و A را در دمای ۲۰°C- ذخیره کنید.

HB Medium

مواد زیر را به محیط کشت CMRL 1066 اضافه کنید:

انسولین ۵ µg/mL

هیدروکورتیزون ۰/ ۳۶ µg/mL

β- رتینیل استات ۰/۱ µg/mL

گلوتامین ۱/۱۷ mM

پنی سیلین ۵۰ U/mL

استرپتومایسین ۵۰ µg/mL

جنتامایسین ۵۰ µg/mL

Fungizone ۱ µg/mL

سرم جنین گاو ۱٪

HBSS

به محلولهای نمکی متعادل در فصل ۶ و در همین ضمیمه رجوع شود.

Hoechst 33258

2- [2 - (4 – Hydroxyphenol) – 6 – benzimidazoyl] – 6 - (1- methyl-4– piperazyl) benzimidazole trihydrochloride

۱) استوک ۱ mg/mL را در HBSS یا D-PBSA بدون فنل رد تهیه کنید.

۲) محلول را در دمای ۲۰°C- ذخیره کنید. برای استفاده محلول را به نسبت ۱:۲۰۰۰۰ (۱µl در ۲۰mL) در D-PBSA یا HBSS بدون فنل رد در pH ۷ رقیق کنید.

نکته ایمنی) چون ممکن است این ماده سرطان زا باشد، با دقت بسیار زیاد با آن کار شود. در یک هود شیمیایی آن را توزین کرده و در موقع کار با آن دستکش بپوشید.

Kanamycin Sulfate(Kannasyn) 10 mg/mL

کانامایسین ۴ ویال ۱g

Hanks' BSS ۴۰۰mL

۱) ۵mL HBSS از یک بطری ۴۰۰mL HBSS به هر ویال اضافه کنید.

۲) به مدت چند دقیقه صبر کرده تا حل شود.

۳) HBSS و کانامایسین را از ویال ها خارج کرده و آنها را به بطری HBSS بازگردانید.

۴) ۵mL دیگر HBSS به هر ویال برای شستشو اضافه کرده و به بطری HBSS بازگردانید. آن را به خوبی مخلوط کنید.

۵) محلول را در مقادیر ۲۰ mL در ظروف استریل توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- ذخیره کنید.

۶) آن را از لحاظ استریلیتی چک کنید: ۲mL از معرف را به ۱۰mL محیط کشت استریل فاقد هرگونه آنتی بیوتیک دیگر اضافه کرده و محلول را در دمای ۳۷°C به مدت ۷۲ ساعت انکوبه کنید.

۷) در غلظت ۱۰۰µg/mL استفاده شود.

Lactalbumin Hydrosylate 5% (10×)

هیدرولیزات لاکتالبومین ۵g

HBSS ۱۰۰mL

۱) حرارت داده تا حل شود.

۲) با اتوکلاو کردن استریل شود.

۳) در غلظت ۰/۵٪ استفاده شود.

Mcllvaines Buffer pH 5.5

	برای تهیه ۲۰mL	برای تهیه ۱۰۰mL
۰/۲M Na_2HPO_4 (۲۸/۴g/L)	۱۱/۳۷mL	۵۶/۸۵mL
اسید سیتریک ۰/۱ M (۲۱ g/L)	۸/۶۳mL	۴۳/۱۵mL

2-Mercaptoethanol

محلول استوک ۵mM ۴µL

HBSS ۱۰ mL

۱) با فیلتراسیون در هود شیمیایی استریل شود.

۲) در دمای ۲۰°C- ذخیره شده یا هر بار یک محلول تازه تهیه شود.

Methocel

به متیل سلولز رجوع کنید.

Methylcellulose (1.8%)

۱) ۷/۲ g متوسل را وزن کرده و آن را به یک بطری ۵۰۰ mL حاوی یک دانه مغناطیسی بزرگ اضافه کنید.

۲) آن را با اتوکلاو کردن استریل کنید. در هنگام اتوکلاو کردن در بطری شل باشد تا بخار به داخل آن نفوذ کند.

۳) ۴۰۰ mL آب UPW استریل که تا ۹۰°C گرم شده به متوسل اضافه کنید.

۴) به مدت یک شب در دمای ۴°C هم زده تا حل شود (در صورتی که عمل همزنی انجام نشود، متوسل به ژل جامد تبدیل می شود).

اکنون محلول حاصل، متوسل ×۲ می باشد و برای استفاده باید با یک حجم مساوی از محیط کشت ×۲ موردنظر رقیق شود. بهتر است که برای توزیع متوسل از یک سرنگ (بدون سر سوزن) به جای پی پت استفاده شود.

۵) برای استفاده، یک سوسپانسیون سلولی را در حجم کمی از محیط کشت رشد اضافه کنید.

Mitomycin C

محلول استوک ۱۰μg/mL (۵۰×)

میتومایسین ویال ۲ mg

۱) ۲۰ mL از HBSS را در یک ظرف استریل اندازه بگیرید.

۲) ۲ mL از HBSS را با سرنگ خارج کرده و آن را به یک ویال میتومایسین اضافه کنید.

۳) اجازه دهید که مخلوط حل شود، محلول حاصل را بیرون کشیده و آن را به ظرف بازگردانید.

۴) به مدت ۱ هفته فقط در دمای ۴°C در تاریکی ذخیره شود (ظرف را با فویل آلومینیومی بپوشانید).

۵) برای زمان های طولانی تر در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

۶) تا ۰/۲۵ μg/mL برای مدت ۱۸ ساعت مجاورت یا ۲۰ μg/mL برای ۱۰ ساعت مجاورت رقیق کنید.

نکته ایمنی) چون میتومایسین سمی است، آن را در ویال تهیه کنید. وقتی که ماده به شکل پودر دستکاری می شود در یک هود شیمیایی کار کنید.

MTT

۱) ۳- (۴ و۵- دی متیل تیازول -۲ - ایل) - ۲و۵- دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) را با غلظت ۵۰mg/mL در D-PBSA حل کنید.

۲) با فیلتراسیون آن را استریل کنید.

نکته ایمنی) MTT سمی است؛ آن را در یک هود شیمیایی وزن کرده و دستکش بپوشید.

Mycoplasma reagents

رنگ (به Hoechst 33258 رجوع شود)

Mountant: گلیسرول در بافر McIlvaines با pH ۵/۵

برای تهیه ۴۰mL

Na_2HPO_4 ۰/۴M (۵۶/۸g/L)	۱۱/۳۷mL
اسید سیتریک ۰/۲M (۴۲g/L)	۸/۶۳mL
گلیسرول	۲۰mL

۱) برای جلوگیری از کاهش فلورسانس Vectashield(Vector) را اضافه کنید (به دستور العمل شرکت سازنده رجوع شود).

۲) pH را چک کرده و در ۵/۵ تنظیم شود.

Mycostatin (Nystatin)

۱) در غلظت ۲ mg/mL (۱۰۰×) تهیه شود:

میکوستاتین ۲۰۰mg

Hanks' BSS ۱۰۰mL

۲) مشابه روش کانامایسین ساخته شود.

۳) غلظت نهایی ۲۰ μg/mL

Naphtalene Black

۱) در Hanks' BSS در غلظت ٪۱ تهیه شود

نفتالن بلک ۱g

Hanks' BSS ۱۰۰mL

۲) حداکثر مقدار ممکن از رنگ را در HBSS حل کنید.

۳) محلول اشباع حاصل را با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف کنید.

PBS

به Phosphate- Buffered Saline رجوع شود.

D-PBSA

به Phosphate- Buffered Saline رجوع شود.

PE

به Phosphate- Buffered Saline /EDTA رجوع شود.

Penicillin

(مثلاً Crystapen benzylpenicillin[sodium])

۱۰۰۰۰۰۰ واحد در هر ویال

۱) استوک با غلظت ۱۰۰۰۰U/mL همانند استوک کانامایسین تهیه شود.

Crystapen ۴ ویال (۴×۱۰⁶ U)

HBSS ۴۰۰mL

۲) در مقادیر ۵-۱۰mL به حالت منجمد در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

۳) در غلظت ۵۰-۱۰۰U/mL استفاده شود.

Percoll

۱) در هنگام خرید به صورت آماده و استریل می باشد. باید Percoll را با محیط کشت یا HBSS رقیق کرد تا به دانسیته مناسب برسد.

۲) اسمولالیتی آن را چک کنید. برای تنظیم اسمولالیتی تا ۲۹۰ mOsm/kg لازم است که ماده رقیق کننده هیپوتونیک یا هیپرتونیک باشد، بنابراین بهتر است ابتدا یک نمونه کوچک را رقیق کرده و اسمولالیتی آن را چک کنید و سپس آن را در تمام نمونه به کار ببرید.

Phosphate- Buffered Saline/ EDTA, 10 mM (PE)

۱) D-PBSA را بسازید.

۲) ۳/۷۲ g/L نمک دی سدیم EDTA را اضافه کرده و به هم بزنید.

۳) توزیع کرده، اتوکلاو نموده و در درجه حرارت اتاق ذخیره کنید.

۴) D-PBSA/ EDTA را برای اغلب کاربردها به نسبت ۱:۱۰ رقیق کرده تا به غلظت ۱ mM برسد یا برای شرایط شلاته کننده بالا (مثلاً تریپسینه کردن سلولهای CaCo-2) به نسبت ۱:۲ (۵mM) رقیق کنید.

Phytohemagglutinin (PHA)

۱) با اضافه کردن HBSS توسط سرنگ به یک آمپول لیوفیلیزه PHA استوک (۱۰۰×) ۵۰۰μg/mL را تهیه کنید.

۲) در مقادیر کوچک توزیع شده و در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

۳) برای استفاده به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شود.

Sodium Citrate/ Sodium Chloride (SSC)

۱) SSC با غلظت ۲۰× تهیه شود:

تری سدیم سیترات (دی هیدرات) ۰/۳M ۸۸/۲g

NaCl ۳M ۱۷۵/۳g

آب ۱۰۰۰mL

۲) به صورت غلظت ۱× یا ۲× رقیق شود.

Streptomycin Sulfate

۱) از یک بطری حاوی ۱۰۰ mL از HBSS استریل، ۲mL برداشته و به یک ویال ۱g استرپتومایسین اضافه کنید.

۲) وقتی استرپتومایسین حل شد، ۲ mL را به ۹۸ mL از HBSS برگردانید.

۳) برای استفاده به نسبت ۱:۲۰۰ رقیق شود. غلظت نهایی باید ۵۰ μg/mL باشد.

Trypsin

۲/۵٪ w/v در NaCl (۰/۱۴ M) ۰/۸۵٪

محلول تریپسین را می توان به صورت تجاری خرید و یا:

۱) یک محلول ۲/۵٪ تهیه شود:

تریپسین (مثلاً Difco ۱:۲۵۰) ۲۵ g

NaCl ۰/۸۵٪ ۱ L

۲) تریپسین را به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت اتاق یا ۱۰ ساعت در دمای ۴°C هم بزنید. اگر تریپسین به طور کامل حل نشد، با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ آن را صاف کنید.

۳) با فیلتراسیون آن را استریل کنید.

۴) در مقادیر ۱۰-۲۰mL توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

۵) برای استفاده آن را ذوب کرده و به نسبت ۱:۱۰ در D-PBSA یا PE رقیق کنید.

۶) تریپسین رقیق شده را در دمای ۴ °C برای حداکثر ۳ هفته نگهداری کنید.

نکته) تریپسین به صورت خام (مثلاً Difco ۱:۲۵۰) یا خالص سازی شده (مثلاً ۳× Sigma یا Worthington تبلور مجدد) وجود دارد. نمونه های خام حاوی چندین پروتئاز دیگر می باشد که ممکن است در تفکیک سلولی مهم باشند اما همچنین ممکن است برای بیشتر سلولهای حساس مضر باشند. روش معمول، استفاده از تریپسین خام می باشد مگر این که زیستایی یا رشد سلولها کاهش یابد، که در این موارد ممکن است از تریپسین خالص سازی شده استفاده شود. تریپسین خالص دارای فعالیت اختصاصی بالاتری بوده و بنابراین باید در غلظت نسبتاً پایین تری استفاده شود (مثلاً ۰/۰۱ یا ۰/۰۵٪). وقتی که از تریپسین خام استفاده می شود آن را از لحاظ میکوپلاسما چک کنید.

Trypsin Versene Phosphate (TVP)

تریپسین (Difco ۱:۲۵۰) ۲۵mg (یا ۱mL، ۲/۵٪)

Phosphate- Buffered Saline, D-PBSA ۹۸mL

Disodium EDTA ($2H_2O$) ۳۷mg

سرم جوجه ۱mL

۱) D-PBSA و EDTA را مخلوط کرده، مخلوط را اتوکلاو نموده و آن را در درجه حرارت اتاق ذخیره کنید.

۲) سرم جوجه و تریپسین را قبل از استفاده اضافه کنید. در صورت استفاده از پودر تریپسین، قبل از اضافه کردن سرم آن را با فیلتراسیون استریل کنید.

۳) محلول را در مقادیر کوچک توزیع کرده و در دمای ۲۰°C- ذخیره کنید.

Tryptose Phosphate Broth

۱) به صورت ۱۰٪ در HBSS تهیه شود.

فسفات تریپتوز (Difco) ۱۰۰g

Hanks' BSS ۱۰۰۰mL

۲) هم زده تا حل شود.

۳) در مقادیر ۱۰۰mL توزیع کرده و در اتوکلاو استریل کنید.

۴) در درجه حرارت اتاق ذخیره شود.

۵) برای استفاده به نسبت ۱:۱۰۰ (غلظت نهایی ۰/۱٪) رقیق شود.

Tyrode's Solution

NaCl ۸ g

KCl ۰/۲ g

$CaCl_2$ ۰/۲ g

۰/۱g $MgCl_2.6H_2O$
۰/۰۵ g $NaH_2PO_4.H_2O$
گلوکز g ۱
UPW تا L ۱
فاز گازی‌هوا

Versene

به EDTA رجوع شود.

Viability Stain

به نفتالن بلک رجوع شود.

تریپان بلو از بسیاری شرکت های سازنده محیط های کشت بافت در دسترس می باشد.

Vitamins

به صورت تجاری در غلظت های ×۱۰۰ موجود می باشد.

۱) به صورت مجزا استوک های ×۱۰۰۰۰–۱۰۰۰ را تهیه کرده و سپس آنها را ترکیب کرده تا یک محلول غلیظ ×۱۰۰ به دست آید.

۲) با فیلتراسیون استریل شود.

۳) در تاریکی و در دمای ۲۰°C- ذخیره شود.

پیوست ۱

تعدادی از رده های سلولی موجود در بانک سلولی انستیتو پاستور ایران

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C101	Vero	African green monkey	Kidney	Fibroblast-like
C102	Seraphina	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C103	BL 28	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C104	BL 40	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C105	CCRF-CEM	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C106	CA46	Human	Skin	Lymphoblast-like
C107	BHK21 (clone-13)	Syrian hamster	Kidney	Fibroblast-like
C108	BHK21-2P (clone-13)	Syrian Hamster	Kidney	.
C109	P3X63Ag8.653	Mouse	.	Lymphoid
C110	B95-8	Cotton-top marmoset monkey(Saguinus oedipus)	Hematopoietic	Lymphoblast and fibroblast-like
C111	CHO	Chinese hamster	Ovary	Epithelial-like
C112	DAUDI	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C113	COR-L105	Human	Lung	Epithelial-like
C114	EL4	Mouse	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C115	HeLa	Human	Cervix	Epithelial-like
C116	G 292 Clone A 141B1	Human	Bone	.
C117	JIYOYE	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C118	1321N1	Human	Brain	Glial-like
C119	KG-1	Human	Bone marrow	Myeloblast-like
C120	JM	Human	Hematopoietic	Lymphocyte
C121	Jurkat E6.1	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C122	K562	Human	Pleural effusion	Lymphoblast-like
C123	McCoy	Mouse	Synovial fluid	Fibroblast-like
C124	RAJI TK+	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C125	MRC-5	Human	Lung	Fibroblast-like
C126	Namalwa	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like

** National Cell Bank of Iran

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C127	RAJI	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C128	RAMOS	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C129	SP2/0-Ag14	Mouse x Mouse	Spleen	Lymphoid
C130	U937	Human	Pleural effusion	Lymphoblast-like
C131	AGS	Human	Stomach	Epithelial-like
C132	B92	Rat	Nervous tissue	Glial-like
C133	YO (YB2/3.Ag30)	Rat	.	Lymphoid
C134	B65	Rat	Nervous tissue	Neuronal-like
C135	MCF-7	Human	Breast	Epithelial-like
C136	A-375	Human	.	Epithelial-like
C137	A549	Human	Lung	Epithelial-like
C138	RAJI TK-	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C139	Caco-2	Human	Colon	Epithelial-like
C140	NIP Gamma4	Human x Mouse	.	.
C141	G-8	Swiss-Webster mouse	Muscle	Myoblast-like
C142	NS0	Mouse	.	Lymphoid
C143	COS-7	African green monkey	Kidney	Fibroblast-like
C144	Hep2	Human	Larynx	Epithelial-like
C145	PLC/PRF/5	Human	Liver	Epithelial-like
C146	SW 742	Human	Colon (colorectal)	Epithelial-like
C147	MOUSE L CELLS (TK+, HBsAg+)	Mouse	.	Fibroblast-like
C148	WIL2.NS.6TG	Human	.	Lymphocyte-like
C149	MOLT-4	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C150	HF2x653	Human x Mouse	.	Lymphoblast-like
C151	U266 B1	Human	Hematopoietic	Lymphoid
C152	KB	Human	Mouth	Epithelial-like
C153	PC12	Rat	Adrenal	Neuronal fibroblasts or spherical clusters
C154	HT29/219	Human	Colon	Epithelial-like
C155	NIH-3T3 D4	NIH Swiss mouse	Embryo	Fibroblast-like
C156	NIH 3T3	Swiss NIH mouse	Embryo	Fibroblast-like
C157	60H9(9)D10.E6	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C158	HEP G2	Human	Liver	Epithelial-like
C159	LCL-PI 1	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C160	Luckes	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C161	L929	C34/An mouse	Connective tissue	Fibroblast-like
C162	3T3 clone A31	Mouse	Embryo	Fibroblast-like
C163	HFFF2	Human	Skin	Fibroblast-like
C164	GC-1spg	Mouse	Testis	.
C165	HGF1-PI 1	Human	Gingiva	Fibroblast-like
C166	HGF2 PI 2	Human	Gingiva	Fibroblast-like
C167	HFSF-PI 3	Human	Skin	Fibroblast-like
C168	HFLF-PI 4	Human	Liver	Fibroblast-like
C169	HFLF-PI 5	Human	Lung	Fibroblast-like

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C170	HFFF-PI 6	Human	Skin	Fibroblast-like
C171	HBMF-SPH	Human	Bone marrow	Fibroblast-like
C172	HNFF-PI 8	Human	Skin	Fibroblast-like
C173	LCL-PI 4	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C174	LCL-PI 5	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C175	LCL-PI 7	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C176	LCL-PI 8	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C177	LCL-PI 11	Human	Liver	Lymphoblast-like
C178	LCL-PI 12	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C180	T45	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C181	KE-37	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C182	SKW3	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C183	DND 41	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C184	RPMI 8402	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C185	HUT-78	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C186	RAEL	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C187	CRI-D2	NEDH rat	Pancreas	Epithelial-like
C188	BAE-1	Bovine/cow	Aorta	Endothelial-like
C189	PC12	Rat	Adrenal	.
C190	HF2FF-PI 14	Human	Skin	Fibroblast-like
C191	HF2KF-PI 15	Human	Kidney	Fibroblast-like
C192	HSF-PI 16	Human	Skin	Fibroblast-like
C193	HSF-PI 17	Human	Skin	Fibroblast-like
C194	HSF-PI 18	Human	Skin	Fibroblast-like
C195	HSF-PI 19	Human	Skin	Fibroblast-like
C196	HN5	Human	Head and neck	.
C197	F3B6	Human x Mouse	.	.
C199	Y-1	Mouse	Adrenal cortex	Epithelial-like
C200	WEHI-164	BALB/c mouse	Muscle	Fibroblast-like
C201	Y79	Human	Eye	Multicellular clusters
C202	CHSE-214	Salmon (Oncorhynchus tshawytscha)	Embryo	.
C203	T-47D	Human	Breast	Epithelial-like, tendency to multilayer
C204	A-431	Human	Skin	Epithelial-like
C206	ACHN	Human	Kidney	Fibroblast-like
C207	SK-BR-3	Human	Breast	Epithelial-like
C208	MDA-MB-468	Human	Breast	Epithelial-like
C209	SK-OV-3	Human	Ovary	Epithelial-like
C210	RPMI 8866	Human	.	Lymphoid
C211	A172	Human	Brain	.
C212	Nalm-6	Confirmed as human with IEF of Ast,G6PD ,MDH,NP	Hematopoietic	Lymphocyte-like
C213	HPB-ALL	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C214	MDA-MB 453	Human	Breast	Epithelial-like patches, single spheres
C215	WM1-LCL-PI 13	Human	Spleen	Lymphoblast-like
C216	CC1-PI 19	Human	Cervix	Epithelial-like
C217	HL-60	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C219	LCL PI 6	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C226	LCL PI 15	human	Hematopoietic	epithelial-like
C227	LCL PI 16	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C229	LCL PI 17	human	Hematopoietic	epithelial-like
C235	LCL PI 24	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C244	LCL-PI 33	Human	Hematopoietic	.
C246	LCL PI 35	human	Hematopoietic	epithelial-like
C249	LCL-PI 65	Human	Hematopoietic	.
C252	LCL PI 41	human	Hematopoietic	epithelial-like
C254	LCL PI 43	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C255	LCL PI 44	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C261	LCL PI 50	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C265	LCL-PI 54	Human	Hematopoietic	.
C269	LCL-PI 58	Human	Hematopoietic	.
C275	LCL PI 64	human	Hematopoietic	epithelial-like
C280	LCL PI 69	human	Hematopoietic	epithelial-like
C289	LCL-PI 78	Human	Hematopoietic	.
C301	LCL PI 90	human	Hematopoietic	epithelial-like
C312	LCL-PI 101	Human	Hematopoietic	.
C315	LCL-PI 104	Human	Hematopoietic	.
C328	LCL-PI 117	Human	Hematopoietic	.
C340	LCL-PI 129	Human	Hematopoietic	.
C344	LCL-PI 133	Human	Hematopoietic	.
C357	LCL-PI 146	.	.	.
C373	LCL-PI 162	.	.	.
C381	LCL-PI 170	.	.	.
C382	LCL-PI 171	.	.	.
C390	LCL-PI 179	.	.	.
C395	LCL-PI 184	.	.	.
C397	LCL PI 186	human	Hematopoietic	epithelial-like
C407	LCL PI 196	human	Hematopoietic	epithelial-like
C412	LCL PI 201	human	Hematopoietic	epithelial-like
C413	LCL PI 202	human	Hematopoietic	epithelial-like
C416	LCL PI 205	human	Hematopoietic	epithelial-like
C417	LCL PI 206	human	Hematopoietic	epithelial-like
C422	P19	Mouse	Embryo	.
C425	Sf 9	Fall army worm (Spodoptera frugiperda)	Ovary	Spherical
C426	MDCK	Canine (Canis familiaris)	Kidney	Epithelial-like
C427	PC-3	Human	Prostate	.

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C428	Du-145	Human	Prostate	Epithelial-like
C429	EJ138	Human	Bladder	Epithelial-like
C430	OVCAR-3	Human	Ovary	Epithelial-like
C431	Calu-6	Human	Lung	Epithelial-like
C432	MDA-MB-175-VII	Human	Breast	Epithelial-like
C433	MDA-MB 361	Human	Breast	Epithelial-like
C434	BT-20	Human	Breast	Epithelial-like
C435	BT-474	Human	Breast	Epithelial-like
C436	TE671/RD	Human	Muscle	Epithelial-like
C437	HT 1080	Human	Muscle	Epithelial-like
C438	Detroit 532	Human	Skin	Fibroblast-like
C439	LNCap-FGC-10	Human	Prostate	Lymphoblast-like
C440	MF1-PI 30	Mouse	Embryo	Fibroblast-like
C441	MSPF-PI 31	Mouse	Spleen	Fibroblast-like
C442	OVC1-PI 32	Human	Ovary	Fibroblast-like
C443	Thr.C1-PI 33	Human	Thyroid	Fibroblast-like
C445	E8 (AGO1522)	Human	Skin	Fibroblast-like
C446	2008/C13.R	Human	Ovary	Epithelial-like
C449	AGO 1522	Human	Skin	Fibroblast-like
C450	5637	Human	Bladder	Epithelial-like
C451	AKATA	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C452	HFF-PI 34	Human	Embryo	Fibroblast-like
C453	Saos-2	Human	.	Epithelial-like
C454	A 2780 CP	Human	Ovary	Epithelial-like
C455	U-373 MG	Human	.	Epithelial-like
C456	Mel-III	Rhesus	Mammary gland	.
C458	SK-Mel-3	Human	Lymph node	.
C459	MIA Paca-2	Human	Pancreas	Epithelial-like
C460	SFLF-PI 35	Sheep	Liver	Fibroblast-like
C461	A 2780 S	Human	Ovary	Epithelial-like
C462	SFLSF-PI 36	Sheep	Liver-Spleen	Fibroblast-like
C464	SFKF-PI 37	Sheep	Kidney	Fibroblast-like
C465	SFAF-PI 38	Sheep	Abomasum	Fibroblast-like
C466	HT29	Human	Colon	Epithelial-like
C467	SFBF-PI 39	Sheep	Brain	Fibroblast-like
C468	SFTF-PI 40	Sheep	Tongue	Fibroblast-like
C469	SFBF-PI 41	Sheep	Bone	Fibroblast-like
C470	SFTF-PI 42	Sheep	Tail	Fibroblast-like
C471	SFTF-PI 43	Sheep	Testis	Fibroblast-like
C472	SFIF-PI 44	Sheep	Intestine	Fibroblast-like
C473	SFSF-PI 45	Sheep	Skin	Fibroblast-like
C478	HTHCL-PI 47	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C479	HHCL-PI 48	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C480	SW 48	Human	Colon	Epithelial-like
C481	SW 1116	Human	Colon	Epithelial-like

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C482	M-NFS-60	Mouse	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C483	J774 A.1	BALB/c Mouse	.	Macrophage-like
C484	BS-C-1	African green monkey	Kidney	Epithelial-like
C485	CDw 32	Mouse	.	.
C486	MA104	African green monkey	Kidney	Epithelial-like
C487	LCL-CB-PI 49	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C488	LCL CL-PI 50	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C489	HCL BMF-PI 51	Human	Bone marrow	Fibroblast-like
C490	SPM4-0	Human x Mouse	.	Lymphoid
C491	HNCF-PI 52	Human	Cervix	Fibroblast-like
C492	183-E95	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C493	BL-41	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C494	EHEB	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C495	DG-75	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C496	DFW	Human	.	Epithelial-like
C497	HEK 293	Human	Kidney	Epithelial-like
C498	293 T	Human	Kidney	Epithelial-like
C499	SW 948	Human	Colon	Epithelial-like
C500	MDBK	Bovine	Kidney	Epithelial-like
C501	NC-37	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C502	HGF3-PI 53	Human	Gingiva	Fibroblast-like
C503	Sf 21	Fall armyworm	Ovary	Spherical
C504	CHO CD28	Chinese hamster	Ovary	Epithelial-like
C505	CARPAS 707	human	.	.
C506	SW 480	Human	Colon	Epithelial-like
C507	CIR-A2	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C508	LS 180	Human	Colon	Epithelial-like
C509	T2	Human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C510	SW 837	Human	Rectum	Epithelial-like
C511	PEER	Human	Hematopoietic	.
C512	1301	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C513	TM4	mouse	Testis, Sertoli cell	epithelial-like
C514	TM3	mouse	Testis, Leydig cell	epithelial-like
C515	NB-4	human	Hematopoietic	Single round and polymorphic cells in suspension
C516	MOLT-17	human	Hematopoietic	Round to elongated single cells in suspension
C517	Hepa 1-6	Mouse	Hepatoma	.
C518	COS-1	African Green Monkey	Kidney	epithelial-like
C519	Daoy	human	brain	Polygonal adherent
C520	KG-1a	Human	Bone marrow acute myelongenous	Lymphoblast-like
C521	C2C12	Mouse	Muscle	Myoblast
C522	NS-1	mouse	Hematopoietic	myeloma

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C523	RK13	Rabit	Kidney	epithelial-like
C524	HMCB	human	Cell Bowes	epithelial-like
C525	C1R-sB7	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C526	RIN-5F	rat	Pancreas	epithelial-like
C527	CHO 1-15 500	Chinese hamster	Ovary	epithelial-like
C528	IEC-18	Rat	Ileum	Epithelial
C529	T2.DR4	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C530	CCRF-HBS-2	human	Hematopoietic	Lymphoblast-like
C531	U-87 MG	human	brain	epithelial-like
C532	CT26	Mouse	Colon	Fibroblast
C533	CT26dsRed	Mouse	Colon	fibroblast
C534	T7-BHK	Hamster	kidney	.
C535	SK-N-MC	Human	Neuroepithelioma	epithelial
C536	RBL-2H3	RAT	Basophilic leukemia	fibroblast
C537	STO	Mouse	Embryo	Fibroblast
C538	CTLL-2	Mouse	Hematopoietic	lymphoblast
C539	Cre-8	Human	kidney	epithelial-like
C540	B16/F10	Mouse	skin	epithelium
C541	IRKHBK	Bovine	Kidney	epithelial-like
C542	BW5147	Mouse	Thymoma	Lymphoblast-like
C543	Mehr-80	Human	Lung	Epithelial like
C544	JEG-3	Human	Choriocarcinoma	Epithelial
C545	2J2-B4	Human	Hemtopoitic	Lymphoblast-like
C547	Waco3-CD5	Human	Hematopoitic	Lymphoblast-like
C548	AAV-293	Human	Kidney	Fibroblast-like
C549	C1300Clone NA	Mouse	brain	Epithelial
C550	P 815	Mouse	Hematopoitic	Lymphoblast-like
C551	BCL1 clone 5B1b	Mouse	Spleen	lymphoblast
C552	YAC-1	Mouse	Hematopoitic	lymphoblast
C553	HL 60/MX1	Human	Hematopoitic	lymphoblast
C554	HUVEC	Human	Umbilical vein	Endothelial-like
C555	MG-63	Human	Bone	Fibroblast
C556	PANC-1	Human	Duct	Epithelial
C557	PA-TU-8902	Human	Pancreas	Epithelial
C558	AsPC-1	Human	Pancreas	Epithelial
C559	AD-293	Human	Embryonic kidney	Epithelial-like
C560	GP-293	Human	Embryonic kidney	Epithelial
C561	BEAS-2B	Human	Bronchus	Epithelial
C562	SK-MES-1	Human	Lung	Epithelial
C563	THP-1	Human	Hematopoietic	Monocyte
C564	FR-E	Human	Lung	Fibroblast-like
C565	QU-DB	Human	Lung	Fibroblast-like
C566	SKLC6	Human	Lung	Fibroblast-like
C567	BH-E	Human	Lung	Fibroblast-like
C568	LS 174T	Human	Colon	Epithelial

NCBI* Code	Designation	Species	Tissue	Morphology
C569	TC-1[JHU-1]	Mouse	Lung	Epithelial
C570	HCT-116	Human	Colon	Epithelial
C571	SW 1353	Human	Bone	Fibroblast
C572	Hela-S3	Human	Cervix	Epithelial
C573	WCH-17	Mouse	Liver	Epithelial
C574	KCL 22	Human	Hematopoitic	Lymphoblast
C575	C6	Rat	Brain	Fibroblast
C576	CHO DG-44	Chinese hamster	Ovary	Epithelial-like
C577	BE(2)-C	Human	Brain	Neuroblast
C578	MDA-MB 231	Human	Brest	Epithelial
C579	P3U1	Mouse	Skin	Lymphoblast
C580	CIRC-HLF	Human	Lung	Fibroblast
C581	CIRC-HLF-CI	Human	Lung	Fibroblast
C582	CLL-CII	Human	Hematopoitic	Lymphoblast-like
C583	CLL-PGA	Human	Hematopoitic	Lymphoblast-like
C584	KYSE-30	Human	Esophageal	Epithelial
C589	293/KDR	Human	Kidney	Epithelial
C591	T/G HA VSMC	Human	Aorta	Fibroblast
C595	Caov-4	Human	Ovary	Epithelial

پیوست ۳

لینک بعضی از کلکسیون های کشت سلولی

Name	Description	Web Address
ATCC	**American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA**	**http://www.atcc.org**
CBCAS	**Cell Bank of Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China**	**http://www.cell.ac.cn/cellbank.html**
CLDB	**Cell Line Data Base**	**http://www.biotech.ist.unige.it**
DSMZ	**Deutsche Sammlung fuer Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany**	**http://www.dsmz.de**
ECACC	**European Collection of Cell Cultures, Wiltshire, UK**	**http://www.ecacc.org.uk**
HSRRB	**Health science Research Resources Bank, Osaka, Japan**	**http://www.jhsf.or.jp**
ICLC	**Interlab Cell Line Collection, Genova, Italy**	**http://www.iclc.it**
IPI	**Institut Pasteur D'Iran, Tehran, Iran**	**http://www.pasteur.ac.ir**
JCRB	**Japanese Collection of Research Bioresources, Tokyo, Japan**	**http://www.cellbank.nibio.go.jp**
KCLB	**Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea**	**http://cellbank.snu.ac.kr**
WFCC	**World Federation of Culture Collections**	**http://wdcm.nig.ac.jp/wfcc**

پیوست ۴

منابعی برای مطالعه بیشتر

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Watson, J. D. (2002). *The molecular biology of the cell*, 4th ed. New York, Garland.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (Eds) (2002). Short Protocols in Molecular Biology, 5th Edition, Vol 1 & 2. Hoboken, NJ, John Wiley & Sons.

Barlovatz-Meimon, G., & Adolphe, M., (2003). *Culture de cellules animales; methodologies, applications*. Paris, Editions INSERM. *A collection of technique-oriented chapters on basic and advanced aspects of tissue culture.*

Butler, M. (ed.). (1991). *Mammalian cell biotechnology, a practical approach*. Oxford, U.K., IRL Press at Oxford University Press. *A useful introduction to basic biotechnology.*

Davis, J. M. (2002). *Basic cell culture, a practical approach*. Oxford, U.K., IRL Press at Oxford University Press.

Doyle, A., Griffiths, J. B., & Newell, D. G. (eds.). (1993). *Cell and tissue culture: Laboratory procedures*. Chichester, U.K., John Wiley & Sons. *A loose-leaf compendium of general and specialized techniques with regular updates. Very expensive, but a very good source for a wide variety of techniques.*

Doyle, A., Hay, R., & Kirsop, B. E. (eds.). (1990). *Living resources for biotechnology*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press. *Useful information on databases and quality control.*

Freshney, R. I., & Freshney, M. G. (eds.). (2002). *Culture of epithelial cells*. New York, Wiley-Liss. *Invited chapters on specialized culture of epithelium; technique oriented.*

Freshney, R. I. (1999). *Freshney's Culture of animal cells, a multimedia guide*. New York, Wiley-Liss.

Freshney, R. I., & Freshney, M. G. (1996). *Culture of immortalized cells*. New York, Wiley-Liss.

Freshney, R. I., Pragnell, I. B., & Freshney, M. G. (eds.). (1994). *Culture of hematopoietic cells*. New York, Wiley-Liss. *Second in the series "Culture of Specialized Cells." Invited chapters on specialized techniques.*

Haynes, L. W. (ed.) (1999). *The neuron in tissue culture*. Chichester, UK, John Wiley & Sons.

Leigh, I. M., Lane, E. B., & Watt, F. M. (eds.). (1994). *The keratinocyte handbook*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press.

Leigh, I. M., & Watt, F. M. (eds.). (1994). *Keratinocyte methods*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press.

Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Kreiger, M., Scott, M. P., Zipursky, S. L., & Darnell, J. (2004). *Molecular cell biology 5th ed*. New York, Scientific American Books, Freeman.

Masters, J. R. W., (ed.), *Animal cell culture, a practical approach*, 3rd ed. Oxford, U.K., IRL Press (2000).

Masters, J. R. W. (ed.). (1991). *Human cancer in primary culture*. London, Kluwer. *Product of a European Tissue Culture Society workshop.*

Masters, J. R. W., & Palsson, B. (1999). (eds.). *Human cell culture*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer.

Pfragner, R., & Freshney, R. I. (eds.) (2004). *Culture of human tumor cells*. Hoboken, NJ, Wiley-Liss. *Invited chapters with culture protocols for several types of human tumors.*

Pollack, R. (ed.). (1981). *Reading in mammalian cell culture*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press. *A very good compilation of key papers in the field. Used as a tutorial, for general interest, and for teaching.*

Ravid, K., & Freshney, R. I. (eds.). (1998). *DNA transfer to cultured cells*. New York, Wiley-Liss. *Invited chapters with practical protocols on DNA transfer technology.*

Shahar, A., de Vellis, J., Vernadakis, A., & Haber, B. (1989). *A dissection and tissue culture manual of the nervous system*. New York, Wiley-Liss. *Useful short protocols; well illustrated.*

Vunjak-Novakovic, G., & Freshney, R. I. (eds.). (2005). *Culture of cells for tissue engineering*. Hoboken, NJ, Wiley-Liss (in press).

Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, Fifth Edition, by R. Ian Freshney

Copyright © 2005 John Wiley & Sons, Inc.

Invited chapters with practical protocols on preparation of cells and matrices for tissue engineering.

Useful Journals

Technique-Oriented Tissue Culture

Cell Preservation Technology
Cytotechnology (now incorporating *Methods in Cell Science*)
In Vitro Cell and Development Biology
Tissue Culture Research Communications (Japanese)

Cell Biology

Cell
Cell Biology, International Reports
Cellular Biology
Cell Growth & Differentiation
Current Opinion in Cell Biology
European Journal of Cell Biology
Experimental Cell Biology
Experimental Cell Research
Journal of Cell Biology
Journal of Cellular Physiology
Journal of Cell Science
Nature Biotechnology
Nature Cell Biology

Cancer

British Journal of Cancer
Cancer Research
European Journal of Cancer and Clinical Oncology
International Journal of Cancer
Journal of the National Cancer Institute

منابع

Freshney R. I. (2005). *Culture of animal cells, A manual of basic techniques.* 5th edition. John Wiley and sons. New Jersey.

http://www.cell-essentials.com/cryo.pdf. *Cryopreservation Manual.* Accessed on 1 December 2008.

http://www.corning.com/Lifesciences/technical_information/techDocs/Subculturing_protocol.pdf. *Subculturing Monolayer Cell Cultures Protocol.* Accessed on 27 November 2008.

http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/ecacc-handbook.html. *Fundamental techniques in cell culture, a laboratory handbook.* Accessed on 27 November 2008.

http://www.ncbi.pasteur.ac.ir/. Accessed on 20 February 2010.

http://www.corning.com/lifesciences/technical_information/techdocs/intro_animal_cell_culture.pdf. Introduction to animal cell culture technical bulletin. Accessed on 10 July 2008.

http://www.corning.com/lifesciences/technical_information/techdocs/cccontamination.pdf. Understanding and managing cell culture contamination. Accessed on 15 October 2008.