



بیوتکنولوژی کشت سلول

آموزشی، علمی، کاربردی

دکتر محمد معصومی
استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی
ژنتیک و زیست فناوری
فرزانه خادمی
مژگان عباسی نوسر



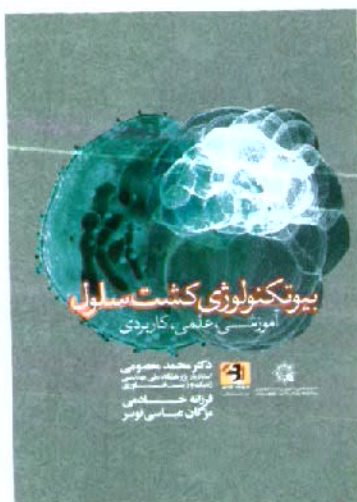
معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری
سازمان پارک فناوری و کارپو سلولهای زیستی

سرشناسه: معصومی، محمد، ۱۳۵۵
عنوان و نام پدیدآور: بیوتکنولوژی کشت سلول: آموزشی، علمی، کاربردی / محمد معصومی،
فرزانه خادمی، مژگان عباسی، نوسر.
مشخصات نشر: تهران: آرتین طب، ۱۳۹۱
مشخصات ظاهری: ۱۷۶ ص: مصور (رنگی)، جدول، نمودار.
شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۸۴۴۳-۶۳-۹ ریال ۱۰۰۰۰
وضعیت فهرست‌ریسی: فیا
موضوع: باخته‌ها - کشت - دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع: باخته‌های بنیادی - دستنامه‌ها
شناسه افزوده: خادمی، فرزانه، ۱۳۵۳
شناسه افزوده: عباسی، نوسر، مژگان، ۱۳۵۴
رده‌بندی کنگره: QH۵۸۵م۶۳۶ ۱۳۹۱
رده‌بندی دیویی: ۵۷۴/۸۷
شماره کتابشناسی ملی: ۲۸۲۷۱۲۲



معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری
مشارکت توسعه پژوهش و کاربرد فناوری‌های بنیادی

عنوان: بیوتکنولوژی کشت سلول
تألیف: دکتر محمد معصومی، فرزانه خادمی، مژگان عباسی، نوسر
ویرایش ادبی: زهرا امامی
مقدمه: دکتر محمد واسعی
دبیر اجرایی: سیدعباس هاشمی‌نژاد
طراح جلد: صادق جمالی
طراح گرافیک: مصطفی جمالی
ناشر: انتشارات آرتین طب
نوبت و تاریخ چاپ: اول، ۱۳۹۱
قیمت: ۱۰۰۰۰۰ ریال
شمارگان: ۱۵۰۰ جلد
شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۸۴۴۳-۶۳-۹
همه حقوق محفوظ است.
کلیه حقوق این اثر متعلق به شرکت دانش بنیان ایده زیست نو ترکیب می باشد.
www.bioidea.ir info@bioidea.ir تلفن: ۶۶۹۳۶۰۲۸ و ۶۶۹۳۵۹۵۱
مرکز بخش:
تهران، بلوار کشاورز، خیابان ۱۶ آذر، پنجاه متر پایین تر از بلوار، شماره ۶۸، طبقه سوم
انتشارات آرتین طب تلفن: ۸۸۹۷۱۴۰۰ دورنگار: ۸۸۹۹۵۱۴۱



بیوتکنولوژی کشت سلول

فصل نخست: مبانی کشت سلول

فصل دوم: ارزیابی بقای سلول

فصل سوم: آلودگی‌های کشت سلولی و روش‌های تشخیص آن

فصل چهارم: روش‌های ذخیره‌سازی سلول‌ها در سرما

فصل پنجم: بانک سلولی

فصل ششم: بیوراکتورها

فصل هفتم: کاربرد سلول‌ها در ژن درمانی و تولید ویروس‌ها

فصل هشتم: سلول‌های بنیادی جنینی و القاشده

بسم الله الرحمن الرحيم

پیشرفت طب بازساختی (Regenerative Medicine) و مهندسی بافت با کشت سلول‌های بنیادی و توانایی دستکاری ژنتیک آن، به مرحله شتاب خود گذاشته است. یکی از چالش‌های مهم پیش روی علم سلول‌های بنیادی، پیدا نمودن متدهای بهتر و موثرتر جهت استخراج، شناسایی، کشت، نگهداری طولانی مدت، دستکاری بدون خطر ژنتیکی و همچنین تولید بافت و ارگان از این سلول‌هاست. ♦

در این گردآوری به اصول ارائه کشت و تکنیک‌ها و نکات ارزشمند آزمایشگاهی در پروسه‌های مختلف آن اشاره شده است. در این مجموعه‌ها، تکنیک‌های بسیار ساده نظیر شمارش سلول تا تکنیک‌های نسبتاً پیچیده و پیشرفته نظیر مهندسی ژنتیک با سبکی روان بحث شده تا خواننده در هر سطحی بتواند مطالب مناسب را برداشت نماید.

در این اختصار ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی از اهتمام و تلاش جناب آقای دکتر محمد معصومی که مطالب کتاب را گردآوری و تدوین نموده‌اند، قدردانی می‌نماید. امید است که علاقه‌مندان و پژوهشگران علوم سلولی با آشنایی به متدهای ذکر شده در این کتاب بتوانند مطالب آنرا دستمایه خود نموده و با طراحی و ابداع روش‌های بهتر و کارآتر باعث پیشرفت بومی این علم در کشور عزیز اسلامی‌مان گردند.

دکتر محمد واسعی

دبیر ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی

دیباچه کتاب

دانش زیست سلولی، مهندسی بافت و کشت سلول‌های بنیادی در طول چند دهه گذشته به صورت یک رشته علمی و مهم درآمده است. در طول این مدت، پیشرفت‌های حاصل شده در این زمینه حرکت انگیز بوده و می‌توان گفت که نتایج آنها تغییرات عمیق در زندگی و حیات ما خواهد داشت. با توجه به اینکه دنیای امروز به عصر جدیدی از دستاوردهای ارزشمند و مهم در زمینه‌های یاد شده تبدیل گردیده است، دانش سلول‌های بنیادی، سلول‌درمانی و مهندسی بافت و کاربرد آنها در درمان بیماری‌های صعب‌العلاج یکی از پایه‌های اساسی تحقیقات و بحث‌های علمی مطرح در جهان شده است.

شرکت دانش بنیان ایده زیست نو ترکیب با هدف انتقال دانش فنی و ارتقاء سطح علمی دانشجویان و پژوهشگران، همچنین تسريع در اجرای پروژه‌های علمی و حصول نتایج کاربردی شکل گرفته است. این شرکت جهت تحقق اهداف یاد شده در زمینه تولید و توزیع فرآورده‌های کشت سلول، برگزاری کارگاه‌های آموزشی و ارائه خدمات تخصصی سلولی و مولکولی به مراکز تحقیقاتی و دانشگاه‌ها فعالیت می‌نماید.

در همین راستا با همکاری استاد گرانقدر جناب آقای دکتر محمد معصومی اقدام به گردآوری مجموعه حاضر نموده است. کتاب بیوتکنولوژی کشت سلول، اولین مجموعه آموزشی، علمی و کاربردی در زمینه کشت سلول است که می‌تواند بهترین راهنمای کاربردی پژوهشگران در انجام روش‌های آزمایشگاهی باشد. این کتاب مشتمل بر اصول و مبانی کشت سلول، سلول‌های بنیادی جنینی، قدرت بقای سلول، روش‌های ذخیره‌سازی سلول‌ها، بانک سلولی و بیوراکتورها می‌باشد که از جدیدترین متون و منابع موجود اقتباس شده است.

در پایان از همکاران و حامیان این مجموعه، دکتر محمد واسعی (دبیر ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی)، دکتر محمد معصومی (هیئت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری) تقدیر و تشکر می‌گردد.

خسرو بیژنگی

مدیرعامل شرکت دانش بنیان ایده زیست نو ترکیب

به نام خداوند جان و خرد

استفاده از سلول برای درمان بیماری‌ها از طریق مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی (Regenerative medicine) در دهه اخیر یکی از موضوعات مورد علاقه و چالش برانگیز جوامع پزشکی بوده است. از طرفی از دیرباز کشت سلول‌های اولیه و سرطانی نامیرا برای بررسی رفتار این سلول‌ها در ظروف کشت (in vitro) در برابر داروها و محرک‌های مختلف در علوم زیستی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. با جداسازی سلول‌های بنیادی جنینی انسانی توسط تامسون در سال ۱۹۹۸ و ظهور انقلاب سلول‌های بنیادی القا شده (induced Pluripotent Stem (iPS) cells توسط یاماناکا در سال ۲۰۰۶ بحث سلول درمانی وارد مرحله تازه‌ای از دوران خود شده است. در کتاب پیش‌رو، سعی بر آن است که از دریچه نگاه آزمایشگاه کشت سلولی به موضوع پرداخته شود و سعی شده پروتکل‌های استفاده شده به صورت شفاف و مرحله به مرحله آورده شود. کتاب حاضر می‌تواند مورد استفاده متخصصین و دانشجویان مرتبط با علوم زیستی و پزشکی که با کشت سلول سروکار دارند، قرار گیرد. تلاش نویسندگان بر آن بوده است که نیازهای مقدماتی تا پیشرفته محققان در بحث بیوتکنولوژی کشت سلول را برآورده سازد. ساختار کتاب به نحوی است که خوانندگان در فصل اول تا چهارم می‌توانند با تعاریف اولیه، مبانی کشت سلول، کشت اولیه و بررسی آلودگی‌های احتمالی به صورت تئوری و عملی آشنا شوند. در فصل پنجم به بانک کردن سلول‌ها پرداخته‌ایم. فصل ششم که تخصصی‌تر است به بررسی روش‌های کشت سلول در مقیاس بالا در بیوراکتور پرداخته است. در فصل هفتم خواننده با ژن درمانی و تولید ویروس‌های مختلف در کشت سلولی آشنا می‌شود. فصل هشتم به بحث سلول‌های بنیادی جنینی و به خصوص (iPS) پرداخته است و دورنمایی از استفاده از این سلول‌ها برای درمان را به روی خواننده باز می‌کند. همان‌طوری که هر کار علمی هرچند کامل خالی از نواقص نیست، نویسندگان این اثر نیز بسیار خرسند خواهند شد که نظریات و پیشنهادات شما خوانندگان محترم را بشنوند. برای این منظور خوانندگان می‌توانند با مراجعه به سایت آزمایشگاه اینجانب به آدرس www.massumilab.com نظریات خود را از طریق E-mail های ارائه شده برای اینجانب ارسال نمایند. از طرفی در این سایت لینک‌های مفیدی برای خبرهای جدید در زمینه سلول‌های بنیادی و همچنین پروتکل‌هایی که می‌تواند مفید باشد، قرار داده شده است. در پایان جا دارد که از زحمات سرکار خانم دکتر لاله نیک‌فرجام که در نوشتن فصل بانک کردن سلول ما را یاری نموده‌اند و سرکار خانم زهرا امامی که کار ویراستاری ادبی کتاب را به عهده داشته‌اند تشکر نماییم. همچنین از حمایت‌های جناب آقای دکتر محمد واسعی دبیر محترم ستاد توسعه پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی و شرکت دانش بنیان ایده زیست نو ترکیب به خصوص جناب آقای سیدعباس هاشمی‌نژاد و خسرو بیژنگی برای تألیف و چاپ کتاب کمال تشکر را داریم.

باسپاس فراوان؛

محمد معصومی، دکترای تخصصی پزشکی مولکولی

مدیر تیم زیست فناوری سلول‌های بنیادی القاء شده (iBT)

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

مقدمه‌ای بر کشت سلولی / ۱۹

فصل اول: مبانی کشت سلول / ۲۱

تعاریف و اصطلاحات معمول در کشت سلولی	۲۲
طراحی آزمایشگاه کشت سلولی	۲۴
هود لامینار	۲۵
محیط کشت	۲۸
چهار نوع عمده ی کشت سلول	۲۸
مباحث بافتی برای کشت سلولی	۲۹
سینک رشد سلول	۳۰
منحنی رشد چیست؟	۳۰
فواید منحنی رشد	۳۲
اصطلاحات منحنی رشد	۳۳
منحنی رشد در عمل (Protocol)	۳۳
فرمول کلی محاسبه سلول برای یک چاهک	۳۷
نمونه سوال	۳۷
Passage Number	۳۷
پیری در اثر همانندسازی Replicative Senescence Hayflick's Limit	۳۷
عوامل بروز پیری سلول در شرایط <i>In vitro</i>	۳۸
تغییرات احتمالی با افزایش پاساژ نامبر در سلول	۳۹
تکنیک‌های گندزدایی (Aseptic Technique)	۳۹
جداسازی سلول‌ها برای کشت اولیه	۴۰
مراحل جداسازی جنین موش برای کشت اولیه	۴۱
مراحل جداسازی جنین مرغ برای کشت اولیه	۴۴
مراحل جداسازی بافت انسان برای کشت اولیه	۴۷
جداسازی سلول‌های بافت برای کشت اولیه در <i>In Vitro</i>	۴۹

فصل دوم: ارزیابی بقای سلول / ۱۸

شمارش و ارزیابی قدرت بقای سلولی Viability	۵۰
شمارش سلولی توسط هموسیتمتر	۵۱
مراحل شمارش سلولی توسط هموسیتمتر	۵۲
نکات کلیدی	۵۴
شمارش هسته سلول با استفاده از هموسیتمتر	۵۵
میکروکریورها (Microcarrier)	۵۶
پارتیکل کانتر (Particle Counter)	۵۶

۵۷	ردیابی توده سلولی Biomass Monitoring
۵۷	استفاده از پروپ فلورسانس
۵۷	آنالیز تصویر Image Analysis
۵۷	روش‌های غیر مستقیم شمارش سلولی
۵۷	تعیین میزان پروتئین سلول
۵۸	تعیین میزان DNA سلول
۵۸	تعیین میزان گلوکز مصرفی سلول
۵۸	سنجش گلوکز اکسیداز
۵۸	سنجش هگزوکیناز
۵۹	آنالیز کننده گلوکز
۵۹	اهمیت قدرت بقای (Viability) سلول
۵۹	کاربرد قدرت بقای سلول Cell viability
۶۰	تکایی در مورد اندازه گیری قدرت بقای سلول Cell viability
۶۰	Dye Exclusion
۶۱	Tetrazolium Assay
۶۱	مراحل آزمایش MTT
۶۲	شمارش تعداد کلونی‌ها Colony - Forming Assay
۶۲	تعیین (LDH Determination)
۶۳	اندازه گیری انرژی درون سلولی Intracellular Energy Charge
۶۳	مرگ سلولی (Cell Death)
۶۴	روشهای اندازه گیری آپوپتوز
۶۴	روش ژل الکتروفورز
۶۵	روش میکروسکوپی فلورسانس
۶۵	روش Peak Sub-G1
۶۶	استفاده از Annexin V-FITC
۶۷	روش TUNEL
۶۸	استفاده از رودامین ۱۲۳ و PI exclusion
۶۹	بررسی فعالیت کاسپاز ۳ (سیتئین آسپارات سرین پروئناز ۳)

فصل سوم: آلودگی‌های کشت سلولی و روش‌های تشخیص آن ۶۸

۷۱	آلودگی‌های کشت سلولی
۷۲	آلودگی‌های باکتریایی
۷۳	آلودگی‌های قارچی
۷۴	آلودگی‌های مخمر (Yeast)

فهرست مطالب

آلودگی‌های مایکوپلاسمایی	۷۴
آلودگی‌های ویروسی	۷۶
آلودگی‌های انگلی	۷۶
مراحل بررسی آلودگی‌های میکروبی	۷۶
مراحل بررسی آلودگی‌های باکتریایی و قارچی	۷۶
مراحل بررسی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی	۷۷
مراحل بررسی مایکوپلاسمای با روش کشت دادن	۷۷
مراحل بررسی مایکوپلاسمای با رنگ آمیزی غیر مستقیم DNA	۷۹
نکات کلیدی	۸۱
آلودگی با دیگر سلول‌های یوکاریوتی	۸۲

فصل چهارم: روش‌های ذخیره‌سازی سلول‌ها در سرما / ۸۱

کرایوبیولوژی Cryobiology	۸۴
مزایای فریز کردن برای نگهداری سلول و یا بافت	۸۴
نکاتی در مورد جلوگیری از صدمات سلولی حاصل از انجماد	۸۴
چک لیست انجماد	۸۴
روش‌های انجام کرایوبیولوژی	۸۵
انجماد آهسته Slow Cooling	۸۵
روش کنترل شده انجماد آهسته	۸۶
روش کنترل نشده انجماد آهسته	۸۶
کرایوپروتکتانت‌ها (Cryoprotectants)	۸۸
انجماد سریع Rapid Cooling	۹۰
کرایوتیوب‌ها	۹۰
شیشه ای کردن	۹۳
نگهداری بافت به روش انجماد	۹۴
نحوه استفاده از تانک ازت	۹۵
آلودگی داخل تانک‌های ازت	۹۶
استریلیزاسیون و انواع روش‌های استریلیزاسیون	۹۶
استریلیزاسیون به روش فیزیکی	۹۷
استریلیزاسیون با گرما	۹۷
استریلیزاسیون با اشعه	۹۸
استریلیزاسیون با فیلتراسیون	۹۸
استریلیزاسیون به روش شیمیایی	۹۸
استریلیزاسیون با مواد شیمیایی	۹۸

فصل پنجم: بانک سلولی / ۹۸

- ۱۰۱ بانک سلولی Cell Banking
- ۱۰۱ مرکز ذخائر زیستی (Bre) Biological Resource Center
- ۱۰۱ مثال هایی از بانک های سلولی و بافت در ایران
- ۱۰۲ مشکلات موجود در اجرای تحقیقات علوم زیستی در ایران
- ۱۰۲ مزایای وجود یک مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی در کشور
- ۱۰۲ مزایای وجود شبکه های منسجم بین مراکز مرتبط با ذخایر زیستی
- ۱۰۳ اهمیت مراحل ذخیره سلول (Cell Banking)
- ۱۰۵ جریان ذخیره سلول در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران
- ۱۰۶ کنترل تعداد پاساژها در بانک سلولی
- ۱۰۷ فواید وجود سلول ذخیره (Seed Stock)
- ۱۰۷ مراحل مطالعه سلول در بانک سلولی
- ۱۰۸ اهمیت مورفولوژی سلول در ذخیره سازی سلول
- ۱۰۹ تجهیزات و روش های بررسی مورفولوژی سلول
- ۱۱۱ فرم ثبت شناسنامه رده های سلولی انسانی و جانوری
- ۱۱۲ بانک خون بند ناف
- ۱۱۲ انواع بانک خون بند ناف
- ۱۱۳ بانک سلول های بنیادی خون بند ناف در ایران
- ۱۱۳ مراحل تهیه سلول های بنیادی خون بند ناف
- ۱۱۴ آزمایشات لازم پیش از فریز کردن خون بند ناف
- ۱۱۵ روش نگهداری و فریز کردن سلول های بنیادی خون بند ناف

فصل ششم: بیوراکتورها / ۱۱۴

- ۱۱۸ بیوراکتورها
- ۱۱۸ مقدمه
- ۱۱۸ بیوراکتورهای مورد استفاده برای کشت سلول های جانوری و تولید بافت های سه بعدی
- ۱۱۹ بیوراکتورها دو تقسیم بندی مختلف دارند
- ۱۱۹ مثال های از دو نوع بیوراکتور موجود
- ۱۲۲ نکاتی در مورد افزایش مقیاس Scale Up
- ۱۲۳ ویژگی بیوراکتورها به منظور مهندسی بافت
- ۱۲۳ داشتن بافت مناسب در بیوراکتور
- ۱۲۴ انتقال جرم از طریق بیوراکتورها (Mass Transfer Trough Bioreactors)

Sensing In Tissue Engineering Bioreactors	ردیابی در بیوراکتورهای مهندسی بافت	۱۲۶
	پارامترهای کلیدی در بیوراکتور مهندسی بافت	۱۲۷
	بیوراکتورهای یکبار مصرف	۱۲۸
	انواع بیوراکتورهای یکبار مصرف	۱۲۸
	بیوراکتورهای غشایی (Membrar Bioreactors)	۱۲۸
Mechanically Driven Wave	بیوراکتورهای محرک شونده با نیروی مکانیکی	۱۳۰
	بیوراکتور هالوفایبر (Hollow Fiber Cell Culture)	۱۳۱
	مزایای استفاده از هالوفایبر	۱۳۱
	سیستم Aousyst هالوفایبر	۱۳۳
	کشت سلولهای پستانداران در بیوراکتور بستر ثابت	۱۳۳
	مزایای بیوراکتورهای بستر ثابت	۱۳۴
	معایب بیوراکتور بستر ثابت	۱۳۴
	کاربردهای بیوراکتور بستر ثابت	۱۳۴
فصل هفتم: کاربرد سلولها در ژن درمانی و تولید ویروسها/ ۱۳۶		
	کاربرد سلول در ژن درمانی و تولید وکتورهای ویروسی	۱۳۹
	رتروویروسها و لنتی ویروسها	۱۴۰
	ساخت لنتی ویروس بیان کننده ژن استئوکلسین	۱۴۲
	اگر بخواهیم یک سلول مانند MSC (Mesenchymal Stem Cell) داشته باشیم که بطور مداوم ژن استئوکلسین را بیان کند چه باید بکنیم؟	۱۴۳
	آدنوویروسها	۱۴۴
	تولید آدنوویروسها	۱۴۴
	Adeno Associated Virus (AAV)	۱۴۶
	تولید AAV	۱۴۷
	آسیبهای زیستی ناشی از کار با ویروسها Virus Biohazard & Precaution و احتیاطهای لازم	۱۴۸
	مراحل تولید وکتورهای رتروویروس و لنتی ویروس	۱۵۰
	روش تولید رترو و لنتی ویروسها	۱۵۱
	مراحل تولید وکتورهای رتروویروس و لنتی ویروس با استفاده از Packaging Cell Lines پایدار	۱۵۳
	اینترگره شدن در ژنوم سلول میزبان با استفاده از ترانس فکشن پایدار	۱۵۳
فصل هشتم: سلولهای بنیادی جنینی و القاشده/ ۱۵۲		
	سلولهای بنیادی جنینی Embryonic Stem Cells	۱۵۵
	تقسیم بندی سلولهای بر اساس توان تمایزی	۱۵۵
	تقسیم بندی سلولهای بنیادی بر اساس منشأ	۱۵۶

۱۵۸	متغیرهای موجود در فرایند تولید iPS
۱۵۸	عوامل پروتئینی تنظیم کننده ی پرتوانی و تقسیم در سلولهای بنیادی انسانی
۱۶۱	روش های انتقال فاکتور
۱۶۱	انتخاب نوع سلول
۱۶۲	تولد اولین سلول بنیادی القایی iPS (Induced Pluripotent Stem Cell)
۱۶۶	روش های مختلف تولید سلول های بنیادی القایی (iPS)
۱۶۷	بازبرنامه ریزی مستقیم به سلول β و امیدهای درمان بیماری دیابت
۱۶۹	بازبرنامه ریزی مستقیم به سلول های قلبی
۱۷۱	بازبرنامه ریزی مستقیم به سلول های نورونی و امیدهای درمان بیماری پارکینسون
۱۷۴	استفاده از سلول های بنیادی برای درمان ضایعات مغزی - نخاعی

منابع / ۱۷۴

فهرست جداول

۱۰	جدول ۱-۱ فوائد کشت سلولی
۱۱	جدول ۲-۱ محدودیت های کشت سلولی
۲۷	جدول ۳-۱ انواع ظروف مورد استفاده در کشت سلولی
۲۸	جدول ۴-۱ تغییر رنگ محیط کشت حاوی فنل رد در pH مختلف
۳۰	جدول ۵-۱ نمونه هایی از مهمترین تیره های سلولی چسبنده
۳۰	جدول ۶-۱ نمونه هایی از مهمترین تیره های سلولی شناور
۳۵	جدول ۷-۱ مثالی از تعداد سلول یک سلول Hela در هر پاساژ سلولی
۴۰	جدول ۸-۱ تکنیک مناسب گندزدایی
۷۶	جدول ۱-۳ مقایسه روش های تشخیصی آلودگی میکوپلازما
۸۹	جدول ۱-۴ انواع مواد کرایوپروتکتانت نفوذپذیر و غیرنفوذپذیر به غشای سلول
۱۰۵	جدول ۱-۵ انواع آزمایش های کنترل کیفیت
۱۰۶	جدول ۲-۵ تعداد پاساژ سلولی از مرحله تهیه ذخیره سلولی تا رسیدن به دست مصرف کننده
۱۰۷	جدول ۳-۵ تعیین زمان مورد نیاز برای تولید استوک یا ذخیره سلولی جدید برای مصرف کننده
۱۱۴	جدول ۴-۵ انجام آزمایش های ویروسی
۱۱۹	نمودار ۱-۶ زیر انواع بیوراکتورهای کشت سلولی
۱۲۶	جدول ۲-۶ بیوراکتورهای مختلف برای مهندسی بافت
۱۲۸	جدول ۳-۶ ذکر انواع بیوراکتورهای یکبار مصرف و شرکت هایی تولید کننده
۱۳۵	جدول ۴-۶ کاربرد بیوراکتورهای بستر ثابت
۱۳۵	جدول ۵-۶ شرکت های ارائه دهنده بیوراکتور بستر ثابت
۱۳۶	جدول ۶-۶ شرکت های ارائه دهنده حامل های ماکروپروژ
۱۴۰	جدول ۱-۷ معیارهای انتخاب و بروس برای ترانس داکشن ژن

فهرست مطالب

۱۵۳	جدول ۲-۷ بعضی از ژن‌ها به همراه آنتی بیوتیک‌ها
۱۶۰	جدول ۱-۸ تعدادی از مولکول‌های شیمیایی و سایر فاکتورهای افزایش دهنده کارایی فرآیند بازبرنامه ریزی
۱۶۲	جدول ۲-۸ خلاصه ای از روش‌های مختلف مورد استفاده برای تولید iPS

فهرست تصاویر

۲۳	شکل ۱-۱ انواع سلول‌ها
۲۴	شکل ۲-۱ چیدمان پیشنهادی یک آزمایشگاه کشت سلول کوچک
۲۵	شکل ۳-۱ چیدمان پیشنهادی یک آزمایشگاه بزرگ کشت سلول
۲۶	شکل ۴-۱ جریان هوا در هود لامینار
۲۷	شکل ۵-۱ چیدمان صحیح (سمت راست) و چیدمان نادرست (سمت چپ) وسایل داخل هود لامینار
۲۹	شکل ۶-۱ چهار نوع کشت سلولی معمول عضو، کشت اولیه، کشت سلول جدا شده و کشت ارگانوتیپیک
۳۱	شکل ۷-۱ منحنی نیمه لگاریتمی رشد سلولی فاز نمایی
۳۳	شکل ۸-۱ مراحل اول ارزیابی منحنی رشد
۳۴	شکل ۹-۱ مراحل دوم محاسبه منحنی رشد سلول
۳۶	شکل ۱۰-۱ مراحل ورود اطلاعات در صفحه Excel و رسم منحنی رشد با کمک صفحه Excel
۳۸	شکل ۱۱-۱ محل قرار گیری لوله‌ها در انتهای کروموزوم
۴۱	شکل ۱۲-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: ضد عفونی کردن شکم موش
۴۲	شکل ۱۳-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: پارگی پوست
۴۲	شکل ۱۴-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: پارگی پوست تا نمایان شدن دیواره شکمی
۴۲	شکل ۱۵-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: باز کردن شکم
۴۲	شکل ۱۶-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: پیدا کردن رحم
۴۲	شکل ۱۷-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: برداشتن رحم
۴۴	شکل ۱۸-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: تشریح جنین از رحم
۴۴	شکل ۱۹-۱ مراحل برداشتن آسپتیک جنین موش برای تهیه کشت اولیه: از بین بردن پرده‌ها و ریز ریز کردن جنین
۴۵	شکل ۲۰-۱ مراحل آسپتیک برداشتن جنین از تخم مرغ: ضد عفونی کردن تخم مرغ
۴۵	شکل ۲۱-۱ مراحل آسپتیک برداشتن جنین از تخم مرغ: شکافتن پوسته
۴۶	شکل ۲۲-۱ مراحل آسپتیک برداشتن جنین از تخم مرغ: جدا کردن پرده ی سفید زیر پوسته
۴۶	شکل ۲۳-۱ مراحل آسپتیک برداشتن جنین از تخم مرغ: برداشتن پرده سفید برای نمایان شدن پرده کوریوالاتونیک
۴۶	شکل ۲۴-۱ مراحل آسپتیک برداشتن جنین از تخم مرغ: سوراخ کردن پرده کوریوالاتونیک
۴۷	شکل ۲۵-۱ مراحل آسپتیک برداشتن جنین از تخم مرغ: برداشتن جنین از تخم مرغ و قرار

- دادن آن در یتری دیش
- ۴۷ شکل ۱-۲۶ مراحل آسپتیک تشریح جنین از تخم مرغ
- ۴۸ شکل ۱-۲۷ حاصل کشت اولیه سلول‌های سنگفرشی کارسنومای ریه انسان
- ۴۸ شکل ۱-۲۸ الک یا صافی یک بار مصرف از جنس پلی پروپیلن و تیوب برای جمع آوری سلول‌های الک شده از سوسپانسیون اولیه سلول و یا بافت نرم
- ۵۲ شکل ۱-۲ (۱) نئوبار (هموسیئومر)
- ۵۵ شکل ۱-۳ شناسایی سلول‌های زنده بر روی لام نئوبار با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو
- ۵۶ شکل ۱-۳ دستگاه شمارشگر سلولی
- ۶۰ شکل ۲-۴ نفوذپذیر شدن غشای سلول مرده به رنگ تریپان بلو
- ۶۰ شکل ۲-۵ ارزیابی بقای با باقی با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو توسط میکروسکوپ
- ۶۳ شکل ۲-۶ فرایندهای آپوپتوز و نکروز سلولی
- ۶۴ شکل ۲-۷ ژل الکتروفورس DNA سلول‌های آیونوتیک شده توسط Camptothecin
- ۶۵ شکل ۲-۸ آنالیز میکروسکوپ فلورسانس از سلول‌های هیبریدوما تحت تأثیر رنگ‌های حیاتی آکریدین نارنجی و برویدیدوم آیدام
- ۶۶ شکل ۲-۹ توزیع DNA سلول‌های هیبریدوما در حال آپوپتوز در کشت سلولی
- ۶۷ شکل ۲-۱۰ آنالیز بیان فسفاتیدیل سیرین و آنکیرین غشای پلاسمایی در کشت سلول‌های هیبریدوما
- ۶۸ شکل ۲-۱۱ اندازه گیری اینتگریتی مینو کندی به رنگ آمیزی رودامین ۱۲۳ و برویدیدوم (PI) در کشت سلول‌های آیداید هیبریدوما
- ۶۹ شکل ۲-۱۲ میزان فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از آنتی بادی کاسپاز ۳ (Phycoerythrin (PE
- ۷۲ شکل ۳-۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محیط کشت آلوده به باکتری
- ۷۳ شکل ۳-۲ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محیط کشت آلوده به قارچ
- ۷۴ شکل ۳-۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محیط کشت آلوده به مخمر
- ۷۵ شکل ۳-۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی محیط کشت آلوده به مایکوپلازما و محیط کشت عاری از مایکوپلازما
- ۷۵ شکل ۳-۵ تشخیص مایکوپلازما به وسیله ی رنگ آمیزی هوخست
- ۷۸ شکل ۳-۶ کلونی *Acholeplasma Laidlawii* در محیط کشت
- ۹۱ شکل ۱-۴ دو نوع کرایوتیوب با درب پیچشی اکسترنال و اینترنال
- ۹۱ شکل ۴-۲ کیسه‌های اورپ (Overwrap)
- ۹۲ شکل ۴-۳ مقایسه روش‌های مختلف فریز کردن
- ۹۲ شکل ۴-۴ وضعیت سلول‌ها را پیش از فریز کردن و بعد از تاوینگ در روش انجماد سریع
- ۹۳ شکل ۴-۵ فرایند کلی فریز کردن به روش شیشه‌ای کردن
- ۹۳ شکل ۴-۶ فرایند کلی تاوینگ به روش شیشه‌ای کردن
- ۹۴ شکل ۴-۷ مقایسه روش شیشه‌ای کردن با انجماد آهسته
- ۹۴ شکل ۴-۸ مقایسه ی دو روش منجمد شده و شیشه‌ای شده در حضور کرایوپروتکتانت

شکل ۹-۴ نمای درونی از دو نوع تانک نیتروژن مایع	۹۵
شکل ۱-۵ شرایط نگهداری سلول در بانک سلولی آمریکا	۱۰۳
شکل ۲-۵ شرایط نگهداری سلول در بانک سلولی اروپا	۱۰۴
شکل ۳-۵ شرایط نگهداری سلول در بانک سلولی ژاپن	۱۰۴
شکل ۴-۵ مراحل Quality Control در جریان ذخیره سازی سلول	۱۰۵
شکل ۵-۵ مراحل مطالعه سلول در یک بانک سلولی	۱۰۸
شکل ۶-۵ نمایی از میکروسکوپ معکوس	۱۰۹
شکل ۷-۵ تعیین موقعیت هسته و سیتوپلاسم در سلول با استفاده از رنگ آمیزی	۱۱۰
شکل ۸-۵ نمای روبرو از وکیوم برای فیلتراسیون سوسپانسیون سلولی	۱۱۱
شکل ۹-۵ فتومیکروگرافی با استفاده از دوربین CCD و انتقال داده‌ها به نرم افزار مناسب بر روی کامپیوتر	۱۱۱
شکل ۱-۶ طرح پایه بیوراکتورهای کشت سلولی ایستا	۱۲۰
شکل ۲-۶ طرح پایه بیوراکتورهای کشت سلولی پویا	۱۲۰
شکل ۳-۶ تفاوت بین کشت سلول‌ها در کشت استاتیک با دینامیک	۱۲۲
شکل ۴-۶ سرعت جریان مبدل	۱۲۵
شکل ۵-۶ روش تهاجمی و غیرتهاجمی مانیتور کردن بافت و سلول در بیوراکتورهای مهندسی بافت	۱۲۷
شکل ۶-۶ دو نوع مختلف از بیوراکتور عنبلی	۱۲۹
شکل ۷-۶ بیوراکتور یکبار مصرف Mechanically Driven Wave	۱۳۰
شکل ۸-۶ طرح کلی سیستم کشت پایه در بیوراکتور هالوفایبر	۱۳۲
شکل ۹-۶ طرح کلی از یک سیستم هالوفایبر Agusyst	۱۳۲
شکل ۱۰-۶ مقایسه دو سیستم شعاعی و مخوری بیوراکتور بستر ثابت	۱۳۳
شکل ۱۱-۶ انواع بیوراکتور بستر ثابت در حجم‌های مختلف	۱۳۵
شکل ۱۲-۶ طراحی یک بیوراکتور بستر ثابت برای مقیاس آزمایشگاهی ۱٫۵ لیتر	۱۳۷
شکل ۱-۷ فرایند Packaging در سلول ۲۹۳T و در نهایت تولید وکتور رترو ویروس	۱۴۱
شکل ۲-۷ ساختار یک آدنوویروس را به عنوان یک سیستم ترانس داکشن ژنی	۱۴۵
شکل ۳-۷ شاتل و پلاسمید آدنوویروس	۱۴۶
شکل ۴-۷ تولید ویروس‌های AAV حاوی ژن خارجی (Transgene)	۱۴۸
شکل ۱-۸ مراحل انتقال هسته سلول پیکری به تخمک بدون هسته و تکثیر آن	۱۵۷
شکل ۲-۸ فرایند کلی تولید سلول‌های پرتوان القا شده (iPS)	۱۵۸
شکل ۳-۸ انتقال ۲۴ ژن کاندیدا به کمک رتروویروس‌ها به فیبروبلاست	۱۶۵
شکل ۴-۸ مراحل و نمودار آزمایش انتقال فاکتورهای رونویسی با استفاده از ناقل‌های سیستمی، دارای مارکر GFP و پروموتور CMV به پانکراس موش	۱۶۹

مقدمه‌ای بر کشت سلولی

کشت سلول را اولین بار هاریسون و کابل به ترتیب در سال ۱۹۰۷ و ۱۹۱۲ برای مطالعه رفتار سلول‌های حیوانی استفاده کردند.

کشت سلول، که در ابتدا کشت بافت نام داشت، به فرآیند جداسازی سلول‌های حیوانی و کشت آن در محیط آزمایشگاه به منظور مطالعه رفتار سلول اطلاق می‌گردد. به کمک کشت سلولی می‌توان:

(۱) فعالیت‌های داخل سلولی از قبیل نسخه‌برداری از DNA و سنتز پروتئین، جزئیات مربوط به متابولیسم، متابولیسم دارو و چرخه سلولی، تمایز و آپوپتوز را مطالعه کرد.

(۲) جریان‌ات داخل سلولی مانند سیگنال ترانسداکشن، نقش ریسپورهای هورمونی، متابولیت‌ها، جریان Ca^{2+} و نحوه انتقال پیام‌ها را بررسی نمود.

(۳) برهم‌کنش سلول‌ها بر روی یکدیگر، که این پدیده شامل مورفوژنز، بقیدگی سلولی، سینتیک نکثیر سلولی، برهم‌کنش با ماتریکس و تعامل محیط است را مورد مطالعه قرار داد.

(۴) استفاده از کشت سلولی برای تولید محصولات بیولوژیکی و نو ترکیب

(۵) تولید سلول‌های نامیرا و تیره‌های سلولی جدید با دست‌کاری ژنتیکی ژنوم سلول‌ها با استفاده از ویروس‌ها و یا مواد سرطان‌زا.

فواید و محدودیت‌های کشت سلولی در جدول شماره ۱-۱ و ۱-۲ فهرست شده است.

جدول ۱-۱ فواید کشت سلولی:

Category	Advantages
Phys-chem environment	Control of pH, temperature, osmolarity
Physiological condition	Control of hormone, nutrient concentrations
Microenvironment	Regulation of matrix, cell-cell interaction
Cell line homogeneity	Selective media, cloning
Characterisation	Cytology, immune staining
Preservation	Liquid N ₂
Validation & accreditation	Origin, history, purity
Replicates and variability	Quantitation
Reagent saving	Reduced volumes, direct access, lower cost
Control of C T	Definition of dose, concentration and time
Mechanisation	Microtitration, robotics
Reduction of animal use	Pharmaceutics, cosmetics; cytotoxicity and screening

جدول ۲-۱ محدودیت‌های کشت سلولی:

Category	Examples
Necessary expertise	Handling Chemical contamination Microbial contamination Cross contamination
Environmental control	Work place Incubation, pH control Biohazards containment and disposal
Quantity & cost	Capital equipment Consumables Medium, serum, plastics
Genetic instability Phenotypic instability	Heterogeneity, variability Dedifferentiation Adaptation Selection
Cell type identification	Expression of markers Histology, cytology Geometry & Microenvironment