

اصول طراحی و ملزومات آزمایشگاهی های کشت سلولی

Principles of Designing & Requirements
of Cell Culture Laboratories

دکتر ناهید عین الهی

مصطفی صابریان

(مدرس دانشگاه علوم پزشکی تهران) (عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران)

الهام شهیدی دلشاد - زهرا ظهیری - سیرا محمد زاده



عنوان و نام پدیدآور	اصول طراحی و ملزومات آزمایشگاه‌های کشت سلولی = Principles of designing and requirements of cell culture laboratories / نویسندگان مصطفی صابریان... [و دیگران].
مشخصات نشر	تهران: مصطفی صابریان، ۱۳۹۵.
مشخصات ظاهری	۱۶۱ص.: مصور، جدول، نمودار.
شابک	۱۸۰۰۰۰ ریال ۴-۴۲۳۲-۱-۹۷۸-۶۰۰۰۰
وضعیت فهرست نویسی	فبا :
پادداشت	نویسندگان مصطفی صابریان، الهام شهیدی دلشاد، زهرا طهیری، ناهید عین‌اللهی، سمیرا محمدزاده.
پادداشت	چاپ اول،
پادداشت	نمابه
موضوع	کشت سلولها -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
شناسه افزوده	صابریان، مصطفی، ۱۳۶۵ -
رده بندی کنگره	QH ۵۷۵/۱۳۹۱
رده بندی دیویی	۶۳۸/۵۷۱
شماره کتابشناسی ملی	۲۱۸۰۲۳۲

شابک: 978-600-04-4223-1

ناشر: مولف

ویراستار ادبی: دکتر مهدی داداشی آرانی

طراحی جلد: نگار پردل

لیتوگرافی: دانش

چاپ و صحافی: دانش

تاریخ انتشار: ۱۳۹۵

نوبت چاپ: اول-۱۳۹۵

تیراژ: ۵۰۰ جلد

- نشانی: تهران-خیابان قدس- کوچه شفیعی- انتشارات دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران،

تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۹۲۷۲۲

حق چاپ محفوظ است

پیش گفتار

امروزه سلولهای بنیادی (Stem Cells) دسترسی به درمان بیماری های صعب العلاج را میسر نموده است. در دیدگاه جدید علم بیولوژی، جایگاه ویژه ای برای شناخت و به خدمت گرفتن سلولهای بنیادی ترسیم شده است. از چندین سال قبل تحقیقات پشماری در زمینه کاربردها و شناخت هرچه بیشتر سلولهای بنیادی انجام شده است و همچنان ادامه دارد. نتایج این تحقیقات کمک شایانی به درمان بیماری های مختلف کرده و افق روشنی را برای آینده ترسیم نموده است. هم اکنون در بیشتر دانشگاه ها، مراکز تحقیقاتی و بیمارستان های کشور امکانات مورد نیاز برای کشت سلولهای بنیادی و چه بسا انجام پروتکل های درمانی فراهم شده است و با این روند، به رشد، امید آن می رود که در آینده ای نزدیک شاهد موفقیت های چشم گیری در این عرصه باشیم.

آزمایشگاه کشت سلولی (یا کشت سلول) منحصر به فردی دارد که با توجه به مسئله بسیار مهم آلودگی (contamination) این امر با دقت خاصی صورت می گیرد. در زمینه طراحی این آزمایشگاه ها نکات کلیدی و کاربردی فراوانی وجود دارد که باعث می شود آزمایشگاه کشت سلول متمایز از سایر آزمایشگاه ها باشد.

لازم و ضروری است فردی که به عنوان کاربر، کشت سلول انجام می دهد دارای اطلاعات وسیعی نه تنها در زمینه بیولوژی سلولی و مولکولی، چه بسا در زمینه طراحی و چیدمان و روش های آلودگی باشد.

امروزه پروتکل ها و روش های بسیار زیادی در فضای مجازی رسایت یا در دسترس است. اما سوال قابل تامل این است که منابع این پروتکل ها و یا فیلم های آموزشی تا چه اندازه معتبر است؟ حتی نمونه های بسیار ساده در این زمینه می تواند منشأ ابهام برای کارکنان آزمایشگاه های سلولی و مولکولی باشد. مثلاً پس از جستجو در منابع اینترنتی مشاهده می شود که اکثر منابع استفاده از دستکش ضخیم را حین انجام کار کشت، ضروری می دانند؛ از سوی دیگر بعضی منابع، کفایت بر استفاده از دستکش ندارند و فقط به ضرورت ضدعفونی کردن دستها با مواد ضدعفونی کننده ی استاندارد اشاره نموده اند. لذا آنچه به امکان طراحی سلیقه ای آزمایشگاه و پروتکل های کشت و احتمال ایجاد خسارات جبران ناپذیر در آزمایشگاه ها، لازم و ضروری است که این روند به شیوه ی علمی و مطابق با منابع معتبر و روش های تایید شده برای جلوگیری از طغیان آلودگی (Contamination Storm) صورت گیرد و به عنوان یک قانون فراگیر در آزمایشگاه به کار رود.

بر این اساس با توجه به ضرورت اطلاعات طراحی آزمایشگاه و شناخت مواد و وسایل کشت بافت این کتاب با پشتیبانی از منابع جامعی همچون کتاب مرجع کشت سلول های حیوانی R. Ian Freshney و استفاده از جدیدترین متدهای ارائه شده در مقالات

معتبر جهان و همچنین پاره ای از دستاوردهای تجربی بسیار سودمند در طراحی و انجام آزمایشات بیولوژی سلولی و مولکولی در دانشگاه های تراز اول علوم پزشکی کشور از جمله دانشگاه علوم پزشکی تهران، برای سهولت دسترسی اساتید و دانشجویان رشته های مرتبط با بیولوژی سلولی و مولکولی گردآوری شده است. این کتاب در ابتدا اصول طراحی آزمایشگاه کشت سلولی را بیان می کند؛ در ادامه تجهیزات مورد استفاده در آزمایشگاه کشت سلولی را معرفی می نماید و با توجه به اهمیت روش های جلوگیری از آلودگی، به بیان تکنیک های کاربردی برای مقابله با این مشکل می پردازد. همچنین بطور مجزا فصلی از کتاب به ایمنی زیستی و ضرورت دانستن آن برای مسئولین و کارکنان آزمایشگاه اختصاص داده شده است. علاوه در مورد مواد و ظروف آزمایشگاهی و نوع استفاده از آنها به نیز مطالبی ارائه شده است. در بخش پایانی کتاب مجموعه ای از پروتکل های کاربردی از منابع معتبر استخراج و برای سهولت دسترسی محققان و دانشجویان گرامی، آورده شده است. امیدواریم نتایج نگارش این اثر که نتیجه کار گروهی کارشناسان و متخصصان این خطه است، راهی باشد برای کمکی هرچند کوچک به ارتقای نظام سلامت و درمان بیماران؛ انشاءالله.

حمزه صابریان (بهار ۱۳۹۵)

فهرست مطالب

فصل اول - طراحی آزمایشگاه

- ۱-۱- برنامه ریزی ها ۲
- ۲-۱- ساختمان و خدمات ۱۰
- ۳-۱- طراحی منطقه ASEPATIC ۱۲
- ۱-۳-۱- منطقه انجم امور استریلیزاسیون ۱۳
- ۲-۳-۱- هود لامینار ۱۴
- ۳-۳-۱- اتاق قرنطینه ۱۴
- ۴-۳-۱- میز کار ۱۵
- ۴-۱- انکوباسیون ۱۵
- ۱-۴-۱- انکوباتورها ۱۵
- ۲-۴-۱- گرمخانه (Hot room) ۱۶
- ۵-۱- اتاق محیط سازی ۲۱
- ۱-۵-۱- آماده سازی محیط کشت: ۲۱
- ۲-۵-۱- ذخیره سازی ۲۳

فصل دوم - تجهیزات

- ۱-۲- شرایط لازم برای یک آزمایشگاه کشت بافت ۲۸
- ۲-۲- منطقه آستیک ۳۰
- ۱-۲-۲- هود لامینار ۳۰
- ۲-۲-۲- سیلندرهای پیپت ۳۴

- ۲۵..... ۲-۲-۲ - پمپ آسپیره کننده
- ۳۶..... ۲-۲-۴ - چرخ متحرک
- ۳۶..... ۲-۲-۵ - میکروسکوپ Invert
- ۳۸..... ۲-۲-۶ - سانتیفریوژ
- ۳۸..... ۲-۲-۷ - حمل، Pipetting و توزیع مایعات استریل
- ۴۶..... ۲-۲-۸ - سل کانتر (شمارشگر سلولی)
- ۴۷..... ۲-۲-۹ - دوربین های CCD و مانیتور
- ۴۸..... ۲-۲-۱۰ - میکرو، سکوم، Dissection
- ۴۸..... ۲-۳-۱ - انکوباسیون
- ۴۸..... ۲-۳-۱-۱ - انکوباتور
- ۴۹..... ۲-۳-۲ - انکوباتور CO₂ مرطوب
- ۵۲..... ۲-۳-۳ - ثبت درجه ی حرارت
- ۵۲..... ۲-۳-۴ - همزن مغناطیسی
- ۵۳..... ۲-۴-۱ - آماده سازی و استریلیزاسیون
- ۵۳..... ۲-۴-۱-۱ - شست و شو
- ۵۳..... ۲-۴-۲ - دستگاه تصفیه کننده آب
- ۵۴..... ۲-۴-۳ - فورهای (oven) خشک کننده و استریل کننده
- ۵۵..... ۲-۴-۴ - استریل کردن با بخار (اتوکلاو)
- ۵۶..... ۲-۴-۵ - ترازوها
- ۵۶..... ۲-۴-۶ - pH متر
- ۵۶..... ۲-۴-۷ - همزن مغناطیسی (Hot plate)

- ۵۷..... ۲-۲-۸- توزیع کننده های اتوماتیک (Automatic Dispensers).....
- ۵۸..... ۲-۲-۹- هدایت سنج.....
- ۵۸..... ۲-۲-۱۰- اسمو متر.....
- ۵۸..... ۲-۲-۱۱- ماشین شستشوی ظروف شیشه ای.....
- ۵۹..... ۲-۵-۵- انبار و ذخیره سازی مواد.....
- ۵۹..... ۲-۵-۱- یخچال و فریزر.....
- ۶۰..... ۲-۵-۲- حازن ذخیره سازی سرد.....
- ۶۱..... ۲-۵-۳- درجه کنترل دما، تانک نیتروژن.....
- ۶۱..... ۲-۶-۶- تهیه نسخه پشتیبان در آبیگاه.....
- ۶۱..... ۲-۶-۱- کامپیوترها و شبده.....
- ۶۲..... ۲-۶-۲- میکروسکوپ Up right.....
- ۶۲..... ۲-۶-۳- فریزرهای با دمای پایین.....
- ۶۳..... ۲-۶-۴- میکروسکوپ Confocal.....
- ۶۳..... ۲-۶-۵- ترموسایکلر (Thermocycling PCR).....
- ۶۴..... ۲-۷-۷- تجهیزات خاص.....
- ۶۴..... ۲-۷-۱- تکنیک میکرواینجکشن (Microinjection).....
- ۶۴..... ۲-۷-۲- شمارشگر کلونی.....
- ۶۴..... ۲-۷-۳- Centrifugal Elutriator.....
- ۶۴..... ۲-۷-۴- فلو سایتومتری (Flow cytometer).....
- ۶۵..... ۲-۸-۸- اقلام مصرفی.....
- ۶۵..... ۲-۸-۱- پیپتها.....

۶۶.....	۲-۸-۲- هموسایتومتر
۶۶.....	۲-۸-۳- ظروف کشت
۶۷.....	۲-۸-۴- ظروف استریل
۶۷.....	۲-۸-۵- سرنگها و سوزنها
۶۸.....	۲-۸-۶- فیلترهای استریلیزاسیون
۶۸.....	۲-۸-۷- گاز غیر استریل و دستمال تنظیف
۶۸.....	۲-۸-۸- ضد عفونی کنندهها

فصل سوم تکنیک های آسپتیک

۷۰.....	۳-۱- اهداف آسپتیک های Aseptic
۷۱.....	۳-۱-۱- حفظ استریلیزاسیون
۷۱.....	۳-۲- عناصر و الزامات محیط Aseptic
۷۱.....	۳-۲-۱- فضای آرام
۷۲.....	۳-۲-۲- سطح میز کار
۷۵.....	۳-۲-۳- بهداشت فردی
۷۶.....	۳-۲-۴- محلولها و محیط کشت
۷۶.....	۳-۲-۵- کشتها
۷۶.....	۳-۳- کارهای استریلیزاسیون
۷۶.....	۳-۳-۱- تمیز کردن
۷۷.....	۳-۳-۲- درپوش
۷۷.....	۳-۳-۳- شعله
۷۸.....	۳-۳-۴- کار با بتری ها و فلاسک ها

۷۸.....	۳-۳-۵ - pipetting
۸۱.....	۳-۳-۶ - انتقال مایعات
۸۱.....	۳-۳-۴ - جریان هود لامینار
۸۴.....	۳-۳-۵ - روش استاندارد
۸۶.....	۳-۵-۱ - پتری دیش ها و پلیت های چند چاهکی
۸۸.....	۳-۶-۶ - دستگاه و تجهیزات
۸۸.....	۳-۶-۱ - بکسورها
۸۹.....	۳-۶-۲ - کشت های غرضمند
۹۰.....	۳-۶-۳ - فشار گاز با O_2

فصل چهارم - ایمنی زیستی و ایمنی

۹۲.....	۴-۱ - ایمنی آزمایشگاهی
۹۲.....	۴-۲ - ارزیابی خطر
۹۳.....	۴-۳ - دستورالعمل های عملیاتی استاندارد
۹۷.....	۴-۴ - امنیت عمومی
۹۷.....	۴-۴-۱ - اپراتور
۹۷.....	۴-۴-۲ - تجهیزات
۹۷.....	۴-۴-۳ - ظروف شیشه ای و اجسام تیز
۹۹.....	۴-۴-۴ - سمیت شیمیایی
۱۰۱.....	۴-۴-۵ - گازها
۱۰۲.....	۴-۴-۶ - نیتروژن مایع

۰۲.....	۷-۴-۴ - سوختن.....
۰۳.....	۵-۴ - آتش سوزی.....
۰۵.....	۶-۴ - اشعه های یونیزان.....
۰۶.....	۱-۶-۴ - نفوذ مواد به بدن.....
۰۷.....	۲-۶-۴ - دور ریختن مواد زاید رادیواکتیو.....
۰۷.....	۳-۶-۴ - پرتوافکنی حاصل از مواد نشان دار.....
۰۸.....	۴-۶-۴ - پرتوافکنی از منابع پرن انرژی.....
۰۸.....	۷-۴ - BIOH. ZAR. S.....
۰۸.....	۱-۷-۴ - مدیریت یولوژیکی.....
۰۹.....	۲-۷-۴ - کابینت های میکروبیولوژی.....
۱۱۲.....	۳-۷-۴ - بیوپسی از بافت های انسانی.....
۱۱۹.....	۵-۷-۴ - دفع زباله های Biohazard.....
۱۱۹.....	۶-۷-۴ - ضد عفونی.....
۱۱۹.....	۸-۴ - اخلاق پزشکی.....
۱۲۰.....	۱-۸-۴ - بافت حیوانی.....
۱۲۰.....	۲-۸-۴ - بافت انسانی.....
۱۲۴.....	۹-۴ - اعتبار بخشی.....
۱۲۴.....	۱-۹-۴ - احراز هویت.....
۱۲۴.....	۲-۹-۴ - اصالت.....
۱۲۵.....	۳-۹-۴ - آلودگی.....

فصل پنجم - مواد و ظروف کشت

۱۲۸	۵-۱-بستره
۱۲۸	۵-۱-۱-اتصال و رشد
۱۲۸	۵-۱-۲-مواد بستر
۱۲۹	۵-۲-انتخاب ظروف کشت
۱۳۵	۵-۲-۱-تهویه ظروف کشت
۱۳۶	۵-۲-۲-سونا جیری و آنالیز
۱۳۷	۵-۲-۳-رشد نامتوازن
۱۳۸	۵-۲-۴-هزینه
۱۳۹	۵-۳-سیستم های تخصصی
۱۳۹	۵-۳-۱-سطح نفوذپذیر
۱۴۰	۵-۴-سطوح تیمار شده
۱۴۰	۵-۴-۱-پوشش ماتریکس
۱۴۱	۵-۴-۲-لایه های تغذیه کننده (Feeder layer)
۱۴۳	۵-۴-۳-ماتریکس های سه بعدی
۱۴۴	۵-۴-۴-لایه های فلزی
۱۴۵	۵-۴-۵-لایه های غیرچسبنده
۱۵۵	منابع