تجهیزات آزمایشگاه کشت ۲

Centrifuge

Steam Sterilizer (Autoclave)

Water Purifier

Pipettor. Variable-volume pipetting device. Also available in fixed volume. The pipettor is not itself sterilized but is used with sterilized plastic tips.

Pipetting Aid. Motorized pipetting device for use with conventional graduated pipettes.

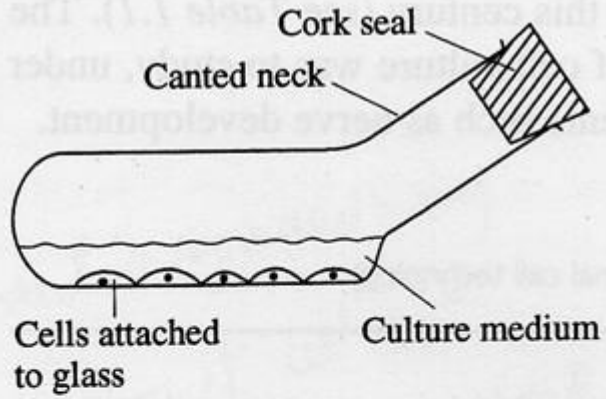


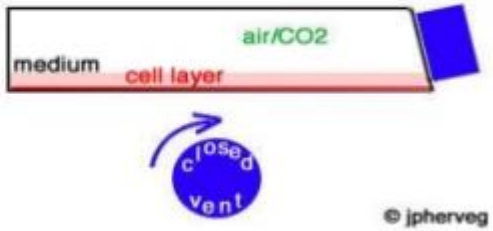
Fig 1.2

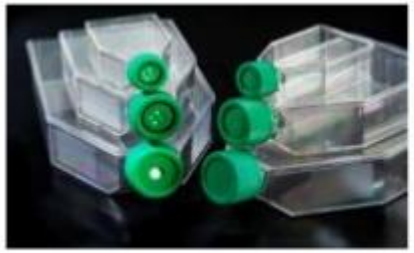
The Carrel flask

◇ Sterile manipulation is facilitated by the narrow angled glass neck of the Carrel flask which can be flamed by a Bunsen burner prior to inoculation or sampling

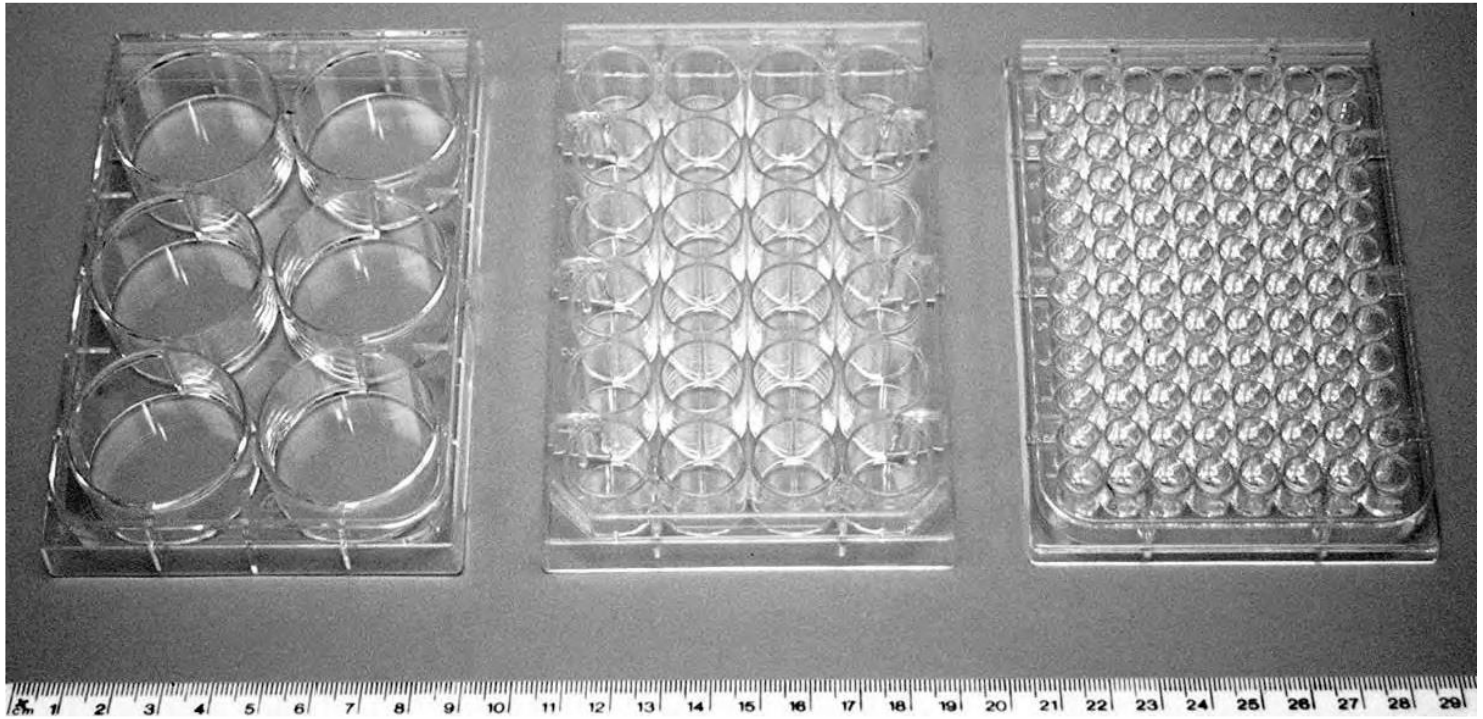
Pyrex® Flasks, Roux culture Bottle, off-set neck

Venting Flasks with a filter cap (T25, T75, T150, T175)





Multiwell Plates

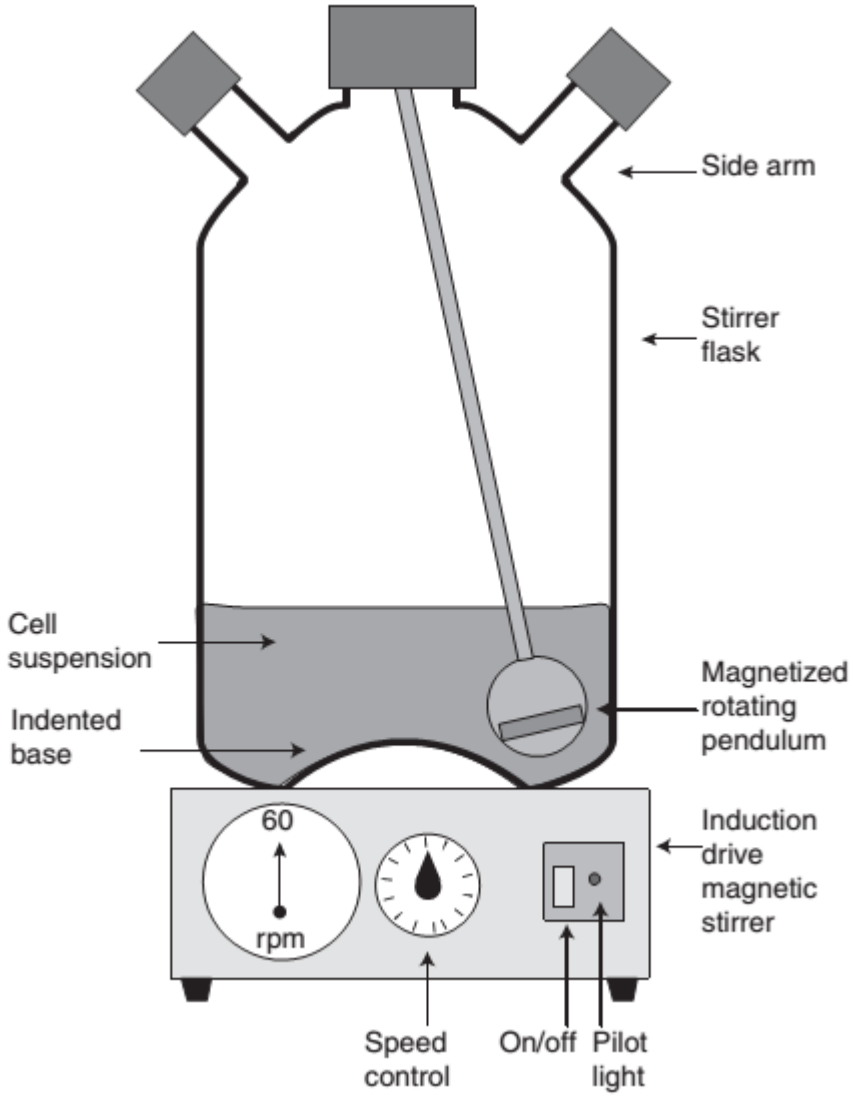


Plates are available with a wide range in the number of wells, from 4 to 144

Cover Slips

Multipoint Pipettor. Pipettor with manifold to take 8 plastic tips. Also available for 4 and 12.

Spinner bottle



چگونگی کشت سلول ها و انتظارات از آن

۱ـ تلقیح (inoculation):

- ✓ هنگامی که سلول ها از یک مجموعه کشت به دست می آید یا از بافت حیوانی جدا می شود و بعد به یک محیط رشد استریل تلقیح می گردد، یک کشت جدید تشکیل می شود.
- ✓ به منظور تامین یک سرعت رشد مناسب، باید دانسیته سلولی **۱۰۵-۱۰۴** سلول بر میلی لیتر محیط کشت باشد.
- ✓ افزایش در غلظت سلولی در یک کشت به صورت نسبت $\mathbf{C_f/C_i}$ بیان می شود که در آن $\mathbf{C_f}$ غلظت نهایی و $\mathbf{C_i}$ غلظت اولیه است.
- ✓ در رشد سلولی به دلیل محدودیت مواد غذایی، تجمع مواد غذایی، تجمع متابولیت های توکسیک یا فقدان سطح رشد در مورد سلول های وابسته به تکیه گاه، توقف ایجاد می شود.

۲ـ ساب کالچر (sub culture):

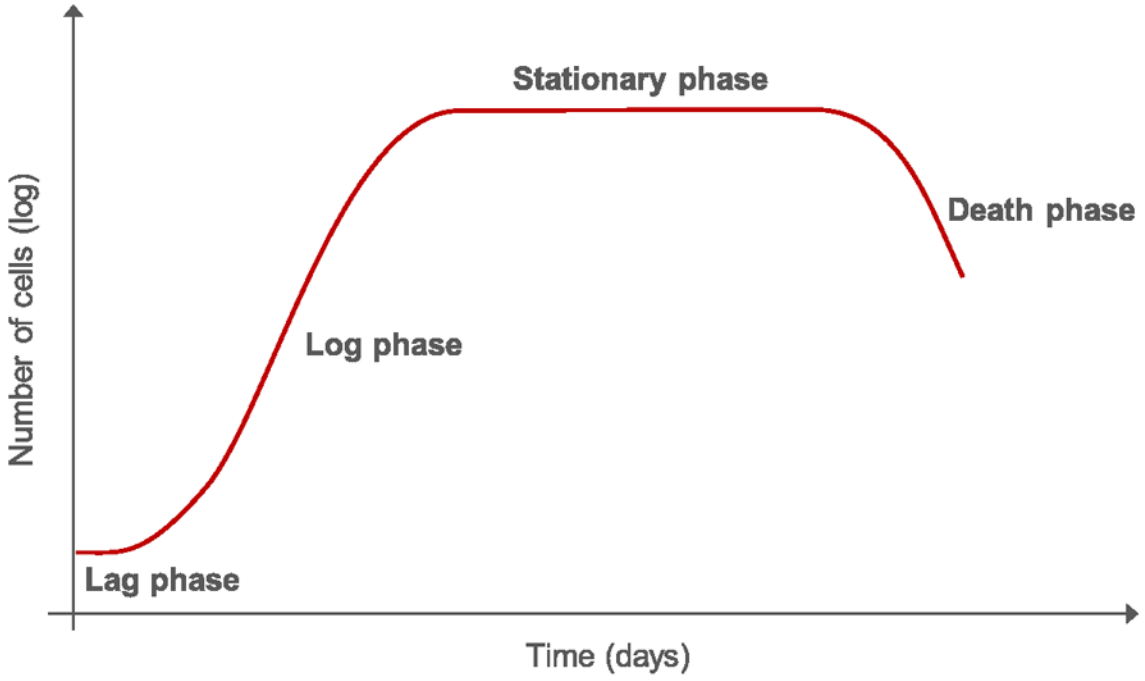
چگونگی کشت سلول ها و انتظارات از آن

۲ـ ساب کالچر (sub culture):

- ✓ هنگامی که سلول ها از رشد باز می ایستند، می توان کشت های جدید را توسط تلقیح تعدادی از سلول ها به محیط کشت تازه ایجاد کرد.
- ✓ اگر پاساژ دادن در روزی انجام شود که حداکثر دانسیته سلولی را داریم، رشد مداوم در کشت جدید را تضمین می کند.
- ✓ اگر سلول ها خیلی پاساژ داده شوند، قابلیت زیست خود را از دست می دهند.
- ✓ برای سلول هایی که در حالت سوسپانسیون رشد می کنند، ساب کالچر دادن شامل رقیق کردن کشت با دانسیته بالا با یک محیط جدید است.
- ✓ ساب کالچر دادن سلول های وابسته به تکیه گاه شامل کندن سلول ها از سطح فلاسک و تلقیح آنها به محیط تازه یک فلاسک جدید می باشد.
- ✓ آنزیم پروتئولیتیکی مانند تریپسین، پروتئین هایی را که به وسیله آن ها سلول ها به سطح کشت متصل می شوندرا تجزیه می کند.
- ✓ اگر یون های کلسیم و منزیم به وسیله یک عامل شلاته کننده مانند EDTA از محیط حذف شوند، کندن سلول ها به وسیله تریپسین موثرتر خواهد بود.
- ✓ فعالیت تریپسین به وسیله اضافه کردن محیط حاوی سرم و سانتریفوژ کردن سلول ها متوقف می شود: پروتئین اضافی در محیط باعث کاهش فعالیت تریپسین می شود.
- ✓ اگر سلول ها در محیط بدون سرم تکثیر شوند از مهار کننده تریپسین سویا جهت خنثی کردن تریپسین استفاده می شود.

چگونگی کشت سلول ها و انتظارات از آن

۳ـ فازهای کشت:



۳ـ۱ـ فاز تاخیری

- ✓ سنتز سلولی فاکتورهای رشد
- ✓ طول دوره این فاز به:
  - فورمولاسیون محیط کشت
  - غلظت ابتدایی سلول ها
  - و وضعیت سلول ها بستگی دارد.

۳ـ۲ـ فاز رشد توانی (exponential)

۳ـ۳ـ فاز سکون: سرعت مرگ و میر برابر سرعت رشد است.

۳ـ٤ـ فاز زوال یا کاهش

$$N = N_0.2^X$$

$$Log_{10}N = Log_{10}N_0 + X.Log_{10}2$$

N = غلظت نهایی سلول

N_0= غلظت اولیه سلول

X = تعداد نسل های رشد سلول

تعداد نسل ها (x) برای یک نمونه تلقیحی با غلظت ۱۰۵ سلول در یک میلی لیتر که به دانسیته ۱۰۶ سلول در یک میلی لیتر می رسد را می توان به روش زیر حساب کرد:

$$Log_{10}10^6 = log_{10}10^5 + X.log_{10}2$$

بنابراین:

$$X = (Log_{10}10^6 – Log_{10}10^5)/Log_{10}2 = 1/Log_{10}2 = 3.32$$

زمان دو برابر شدن در هنگام رشد سلول را می توان از معادله زیر به دست آورد.

$$t_D = T/X$$

t_D = زمان دو برابر شدن

T= زمان سپری شده

X = تعداد نسل ها