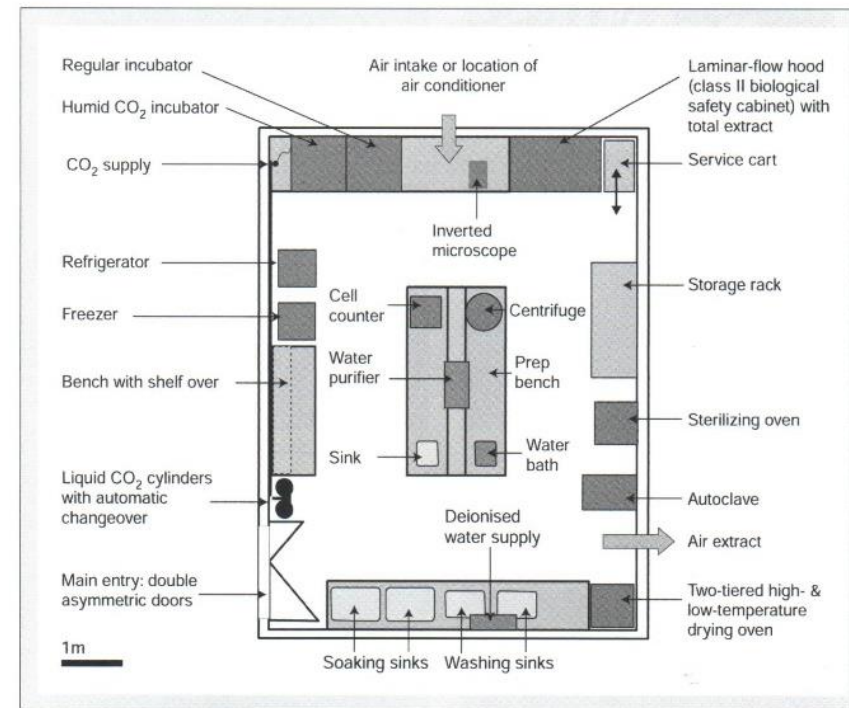


تجهيزات آزمایشگاه کشت سلول

## طراحی آزمایشگاه کشت سلولی

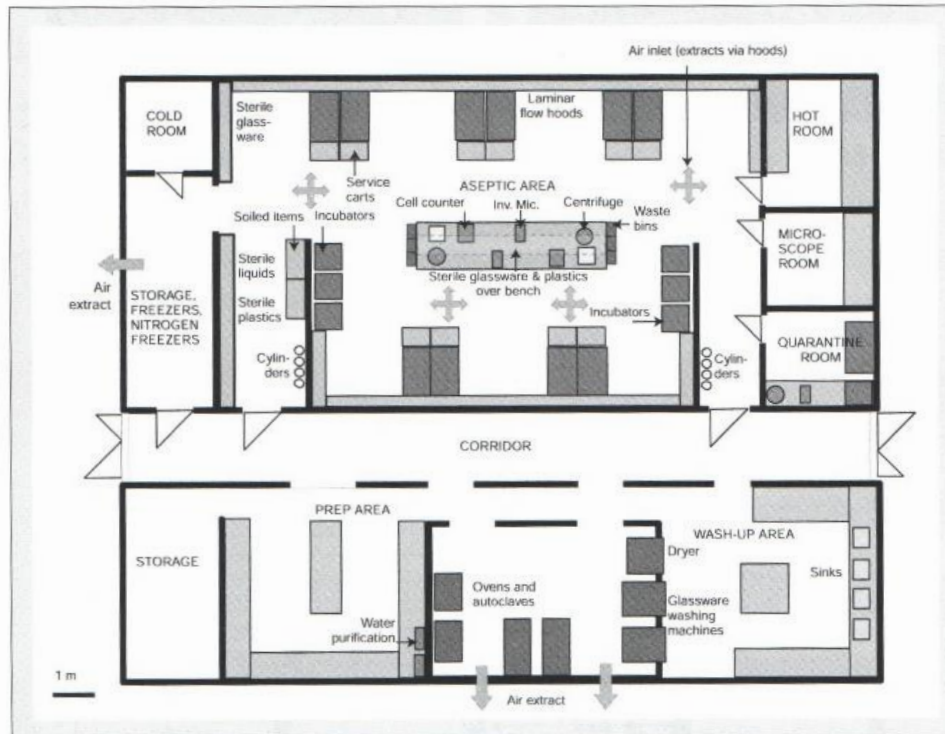
اتاق کشت باید فضایی کوچک با حداقل رفت و آمد باشد. از وسایل و تجهیزاتی که به راحتی ضد عفونی شوند مانند کابینت و میزهای استیل استفاده شود. چیدمان و طراحی مناسب نحوه قرارگیری تجهیزات و وسایل مورد نیاز نقش مهمی در کاهش آلودگی و کیفیت محصول دارد.

کابینت اتاق کشت باید از جنس استیل باشد و در یک گوشه آن و دور از روشویی قرار بگیرد. تجهیزات این اتاق سانتریفوژ، انکوباتور، بافرها و ظروف شیشه‌ای است (شکل ۱-۲). این چیدمان برای جایی است که هود لامینار در دسترس نباشد. استفاده از هود لامینار به راحتی گرادیان استریلیتی را در آزمایشگاه کشت سلولی ایجاد می‌کند. جریان آرام افقی هود، این گرادیان را آسان تر حفظ می‌کند (اگرچه استفاده از جریان آرام افقی در حال حاضر از نظر مقررات ایمنی محدودیت دارد).



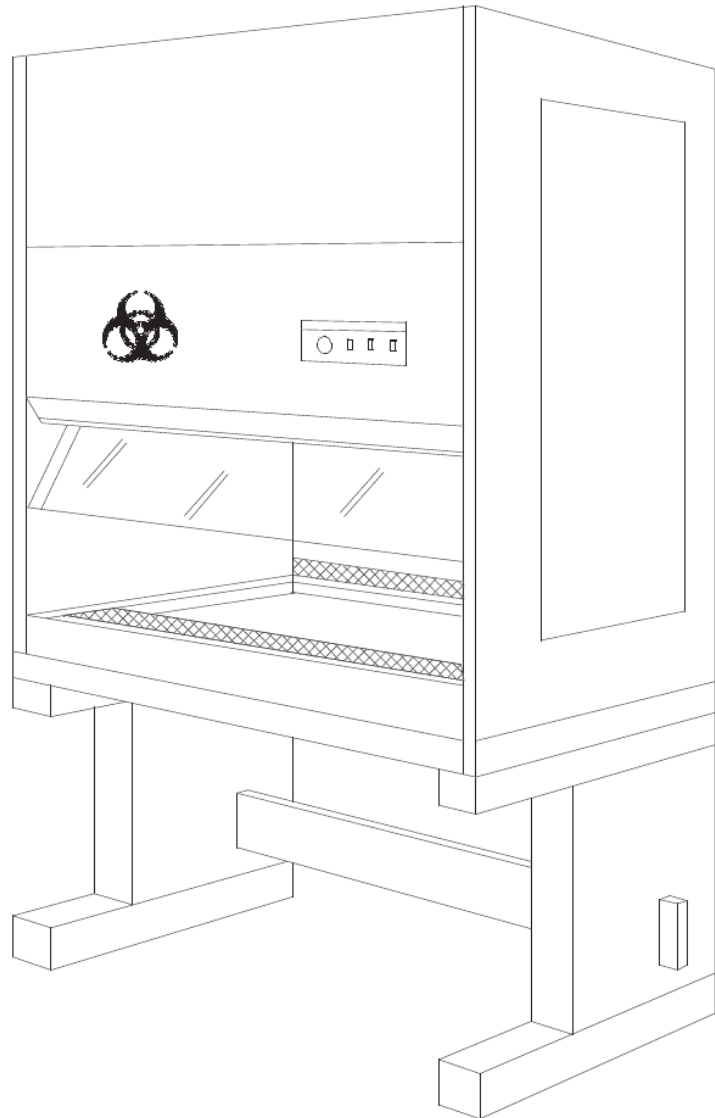
شکل ۱-۲- چیدمان پیشنهادی یک آزمایشگاه کشت سلول کوچک. هدف از این طراحی، دستیابی به گرادیان استریلیتی با شرایط مطلوب در بالا گوشه‌ی راست برای قرار گرفتن هود لامینار است.

یک آزمایشگاه بزرگ کشت سلول معمولاً از دو قسمت مجزا شامل یک منطقه یا اتاقک کوچک ایزوله‌ای که داخل آزمایشگاه تعبیه شده است و یک قسمت آماده‌سازی یا پرپ (Prep) تشکیل می‌شود. وجود منطقه ایزوله از آلودگی‌های ناشی از رفت و آمد کارکنان آزمایشگاه می‌کاهد. مواد و سلول تازه به فضای آزمایشگاه وارد و پس از بررسی از نظر آلودگی برای کشت به قسمت ایزوله منتقل می‌شود. ترجیحاً برای جلوگیری از باز شدن بی‌مورد در اتاقک ایزوله، در و دیوارهای آن از شیشه ساخته می‌شوند. اتاقک ایزوله خود به تجهیزاتی همچون انکوباتور، فریزر، یخچال، سانتریفوژ و نیز هودی که قابلیت به دام انداختن و خروج پاتوژن را داشته باشد، نیاز دارد (شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳. چیدمان پیشنهادی یک آزمایشگاه بزرگ کشت سلول. دو منطقه آماده‌سازی و ذخیره‌سازی به یکدیگر راه دارند. سایه‌های تیره محل قرارگیری تجهیزات و سایه‌های روشن وسایل ثابت و متحرک را نشان می‌دهد.

## اصول عملکرد هودهای بیولوژی



- هودهای بیولوژی ایمنی، از یک کابینت معمولاً از جنس استیل، دارای پنجره شیشه ای در قسمت جلو با ارتفاع قابل تنظیم، سیستم تهویه با موتور الکتریکی، هواکش و مجموعه ای از کانال ها که داخل کابینت فشار منفی ایجاد می کنند، ساخته شده اند.
- این سیستم برای حفاظت کاربر از داخل به سمت بیرون، لایه ای از هوا تولید می کند.
- در داخل کابینت، هوا پس از عبور از یک سری کانال ها به فیلترهایی با کارایی بالا (HEPA (High Efficiency Particulate Air) می رسد.
- فیلتر HEPA: یک فیلتر که می تواند ذرات ریز با قطر  $0.3$  میکرون را با کارایی  $99/97\%$  حذف کند. این فیلترها از میکروفیبرهای سیلیکات بور که با قدرت چسبندگی مولکول های آب به هم متصل هستند، ساخته شده اند.
- باتوجه به طراحی کابینت ها، هوای داخل آزمایشگاه با روش های مختلف بازیافت می شود.
- جریان هوا که در هودهای کلاس II از فیلتر به سطح کار حرکت می کند، لایه ای و آرام است.

عوامل میکروبی یا میکرواورگانیسم‌ها با توجه به نوع میکروب، مقادیر<sup>۲</sup> بیماریزا، نحوه انتقال، میزبان، دسترسی به روش‌های پیشگیری، و مؤثر بودن درمان بیماری به چهار گروه طبقه‌بندی شده‌اند:

۱. **گروه خطر سطح ۱**<sup>۳</sup>: گروهی از عوامل بیولوژی که در انسان سالم و حیوانات بیماری ایجاد نمی‌کنند (بدون خطر فردی و اجتماعی).
۲. **گروه خطر سطح ۲**: گروهی از پاتوژن‌ها که در انسان و حیوانات بیماری ایجاد می‌کنند و برای پرسنل آزمایشگاه، جامعه، حیوانات اهلی و محیط در شرایط عادی خطرناک نیستند. پرسنل آزمایشگاهی که در مواجهه با این نوع پاتوژن‌ها باشند، به ندرت دچار بیماری‌های جدی می‌شوند. روش‌های جلوگیری و درمان مؤثر وجود دارد. همچنین، خطر انتشار این نوع پاتوژن‌ها محدود است (خطر کم فردی و خطر اجتماعی محدود).
۳. **گروه خطر سطح ۳**: گروهی از پاتوژن‌ها که معمولاً سبب بروز بیماری جدی در انسان و حیوانات می‌شوند و اثرات جدی اقتصادی به دنبال دارند. ولی عفونت از یک فرد به فرد دیگر با تماس معمولی منتقل نمی‌شود. بیماری ایجاد شده با داروهای ضد میکروبی و یا ضد انگل درمان پذیر است (خطر زیاد فردی و خطر اجتماعی کم).
۴. **گروه خطر سطح ۴**: گروهی از پاتوژن‌ها که معمولاً بیماری خیلی جدی در انسان و یا حیوانات ایجاد می‌کنند و درمان قطعی ندارند. این پاتوژن‌ها به آسانی از یک فرد به فرد دیگر، یا از حیوان به انسان و یا برعکس، به صورت مستقیم یا غیرمستقیم و یا با تماس معمولی می‌توانند انتقال یابند (خطر بسیار زیاد فردی و اجتماعی).

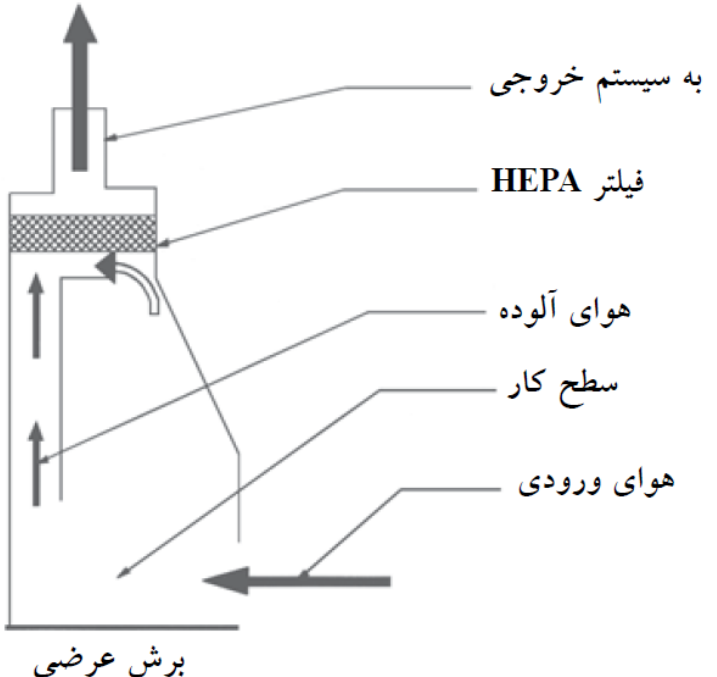
### BIOLOGICAL SAFETY<sup>1</sup>

Microorganisms have been classified into four categories based on factors such as pathogenicity, infectious doses, transmission modes, and host range, availability of preventive measures and effectiveness of treatment for the disease caused.

1. **Risk level 1 group** is composed of biological agents very unlikely to cause sickness in healthy humans or animals. (No individual and community risk).
2. **Risk level 2 group** is composed of pathogens which cause sickness in humans or animals but unlikely to be dangerous to laboratory workers, the community, domestic animals or the environment under normal circumstances. Those exposed in the laboratory rarely become seriously ill. There are preventive measures and effective treatment available and the risk of dissemination is limited. (Moderate individual risk, limited community risk).
3. **Risk level 3 group** is composed of pathogens which usually cause serious sicknesses to human beings and animals and produce a serious economic impact.

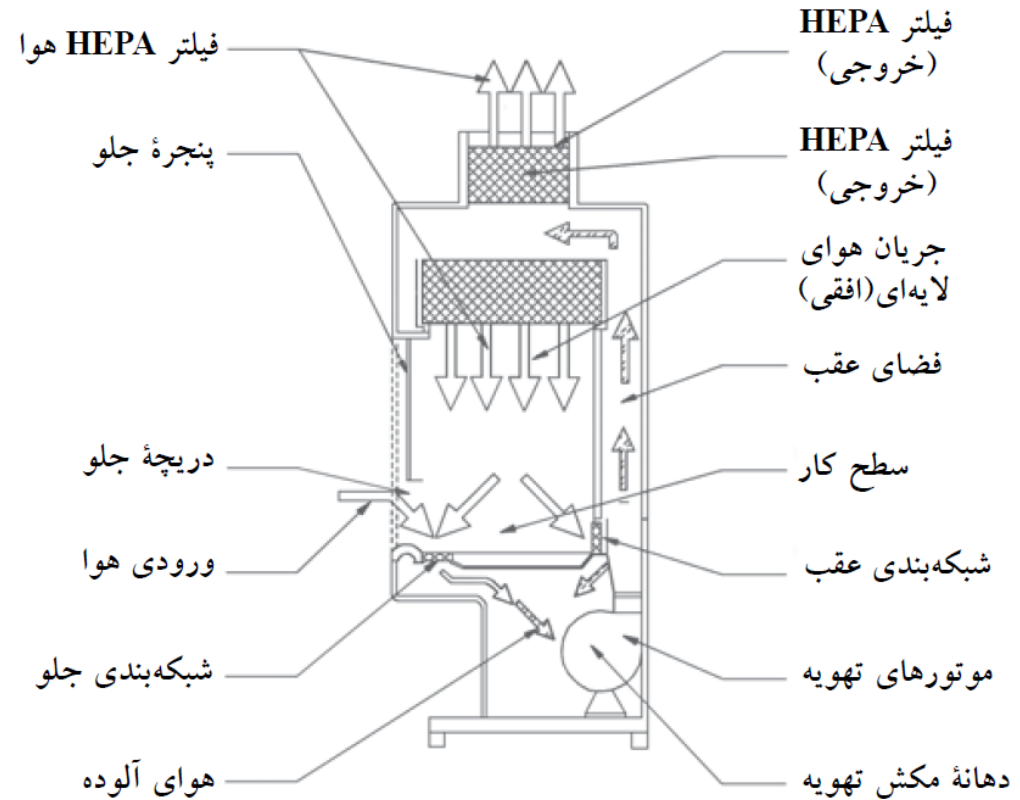
However, infection by casual contact by one individual to another is not common. The sicknesses these produce are treatable by antimicrobial or anti-parasitic agents. (High individual risk, low community risk).

4. **Risk level 4 group** is composed of pathogens which usually produce very serious sicknesses in human beings or animals, frequently without treatments available. These agents are easily spread from one individual to another or from animal to human being or vice versa, directly or indirectly or by casual contact. (High individual risk, high community risk).

مشخصات	نوع هود، با تصویر
کلاس I - نوع A	
<p>۱. امکانات: حفاظت کاربر و محیط.</p> <p>۲. سرعت هوا حین ورود به هود: ۳۸ سانتی متر بر ثانیه (cm/s).</p> <p>۳. مناسب برای کار با عوامل گروه خطر سطح ۱، ۲ و ۳.</p> <p>۴. سیستم تهویه با کارایی بالا، سیستم خروجی که ممکن است به فضای بیرون ارتباط داشته یا نداشته باشد.</p> <p>۵. معایب: مانع آلودگی نمونه مورد آزمایش در کابینت نمی شود.</p>	 <p>به سیستم خروجی</p> <p>فیلتر HEPA</p> <p>هوای آلوده</p> <p>سطح کار</p> <p>هوای ورودی</p> <p>برش عرضی</p>

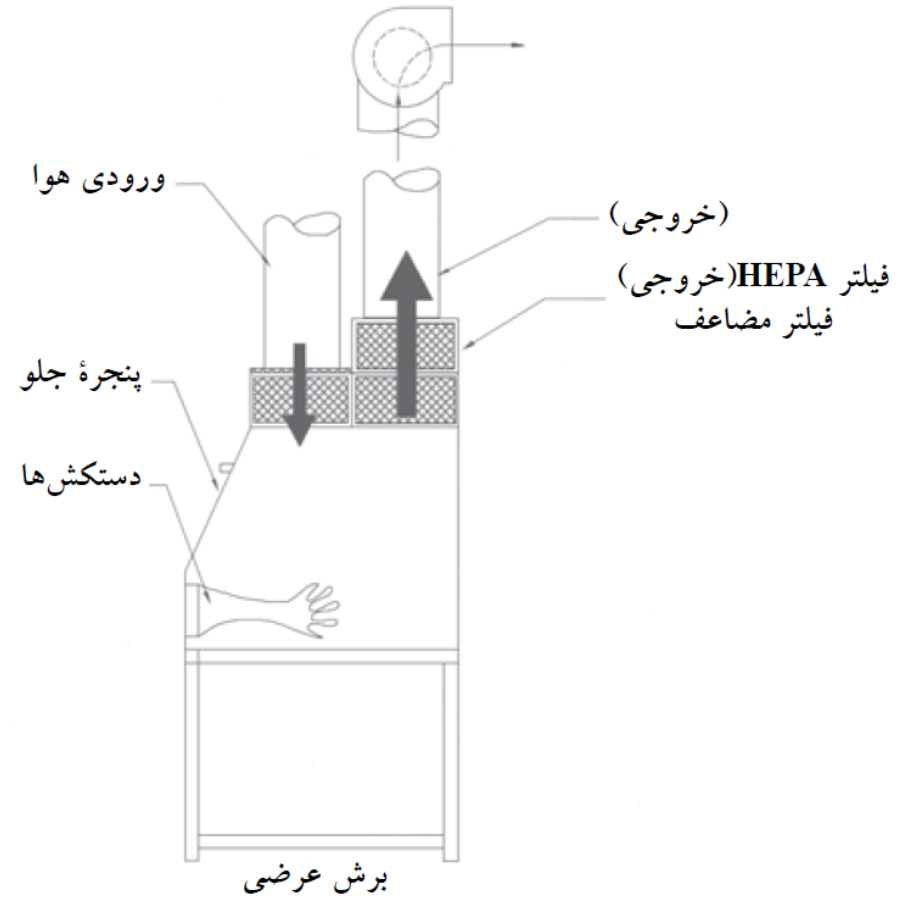
## کلاس II - نوع A

۱. امکانات: حفاظت کاربر، نمونه و محیط.
۲. سرعت هوا در حین ورود به هود: ۳۸ سانتی متر بر ثانیه (cm/s).
۳. مناسب برای کار با عوامل گروه خطر سطح ۱، ۲ و ۳.
۴. سیستم تهویه: دو فیلتر با کارایی بالا، یکی در قسمت سطح کار هود نصب شده است؛ فیلتر دوم در سیستم خروجی که ممکن است به فضای بیرون ارتباط داشته باشد، نصب شده است.
۵. این مدل ۷۰٪ حجم هوا را بازیافت<sup>۲</sup> و ۳۰٪ باقی مانده را جایگزین<sup>۳</sup> می کند.

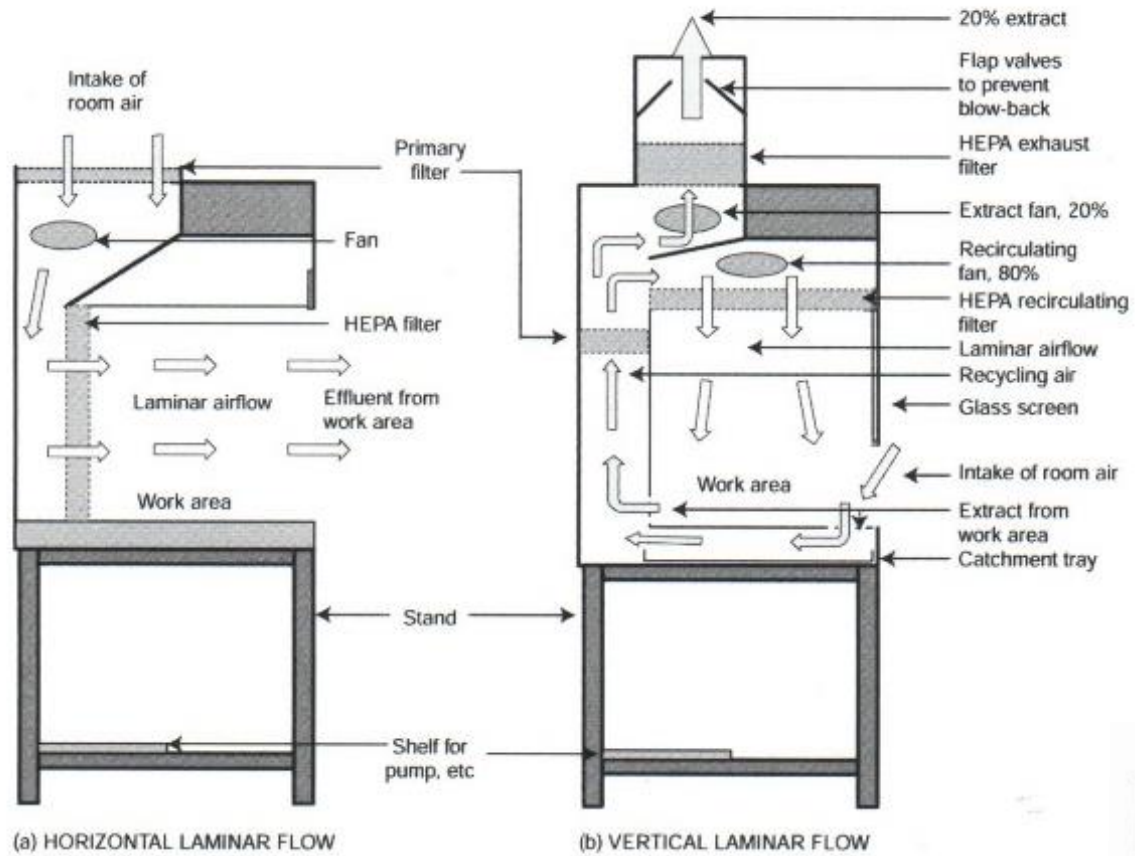


### کلاس III

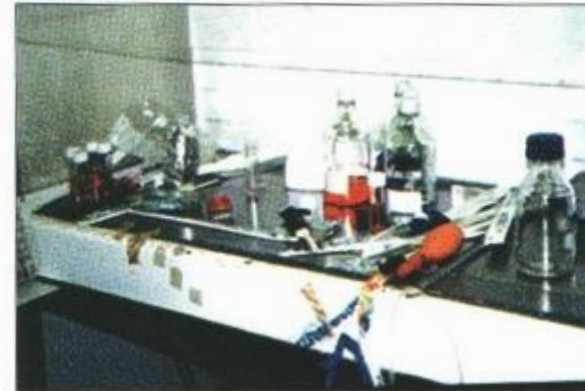
۱. امکانات: حفاظت کاربر، نمونه و محیط.
۲. سیستم تهویه: دو فیلتر با کارایی بالا در محل خروج، یک فیلتر با کارایی بالا در محل مکش.
۳. مناسب برای کار با عوامل گروه خطر سطح ۴.
۴. محفظه هود کاملاً بسته است. تمام موادی که وارد هود می شوند یا از آن خارج می گردند از طریق محفظه های دودریچه ای<sup>۱\*</sup> به هم ارتباط دارند. هر تغییر و آماده سازی مواد با استفاده از دستکش های متصل به قسمت جلوی هود امکان پذیر می باشد.







شکل ۱-۴- جریان هوا در هود لامینار. فلش‌ها علامت جهت جریان هوا است. تصویر سمت چپ (a) جریان افقی و تصویر سمت راست (b) جریان عمودی.

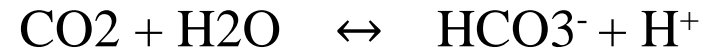


شکل ۱-۵- چیدمان صحیح (سمت راست) و چیدمان نادرست (سمت چپ) وسایل داخل هود لامینار.



■ انکوباتور CO<sub>2</sub> یک وسیله لازم و اساسی برای نگهداری **دمای ثابت**، **رطوبت** و **CO<sub>2</sub>**

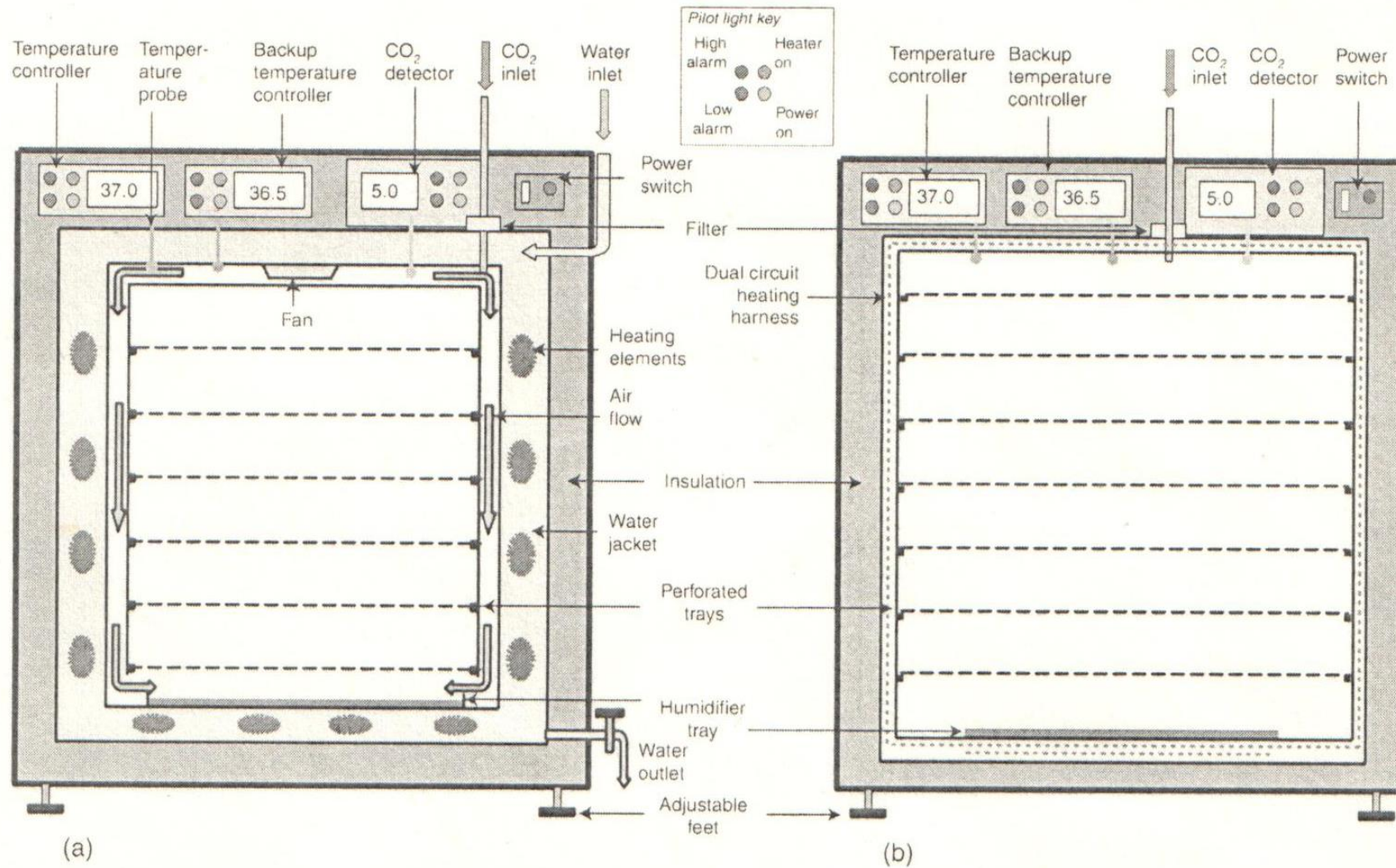
■ اتمسفر غنی از CO<sub>2</sub> محفظه انکوباتور، به عنوان یک سیستم بافری عمل می کند که در تعادل با بیکربنات موجود در محیط کشت می باشد.



■ سطح CO<sub>2</sub> مورد نیاز برای حفظ pH محیط کشت، حدود ۷/۴ - ۶/۹ بستگی به غلظت بیکربنات در محیط کشت دارد.

■ سطح CO<sub>2</sub> غیرطبیعی در انکوباتور به وسیله تغییر در pH محیط کشت و در نهایت رنگ محیط، خودش را نشان می دهد.

*CO<sub>2</sub> Incubator. CO<sub>2</sub> incubator (Forma) with door open showing flasks, multiwell plates and boxed Petri dishes.*

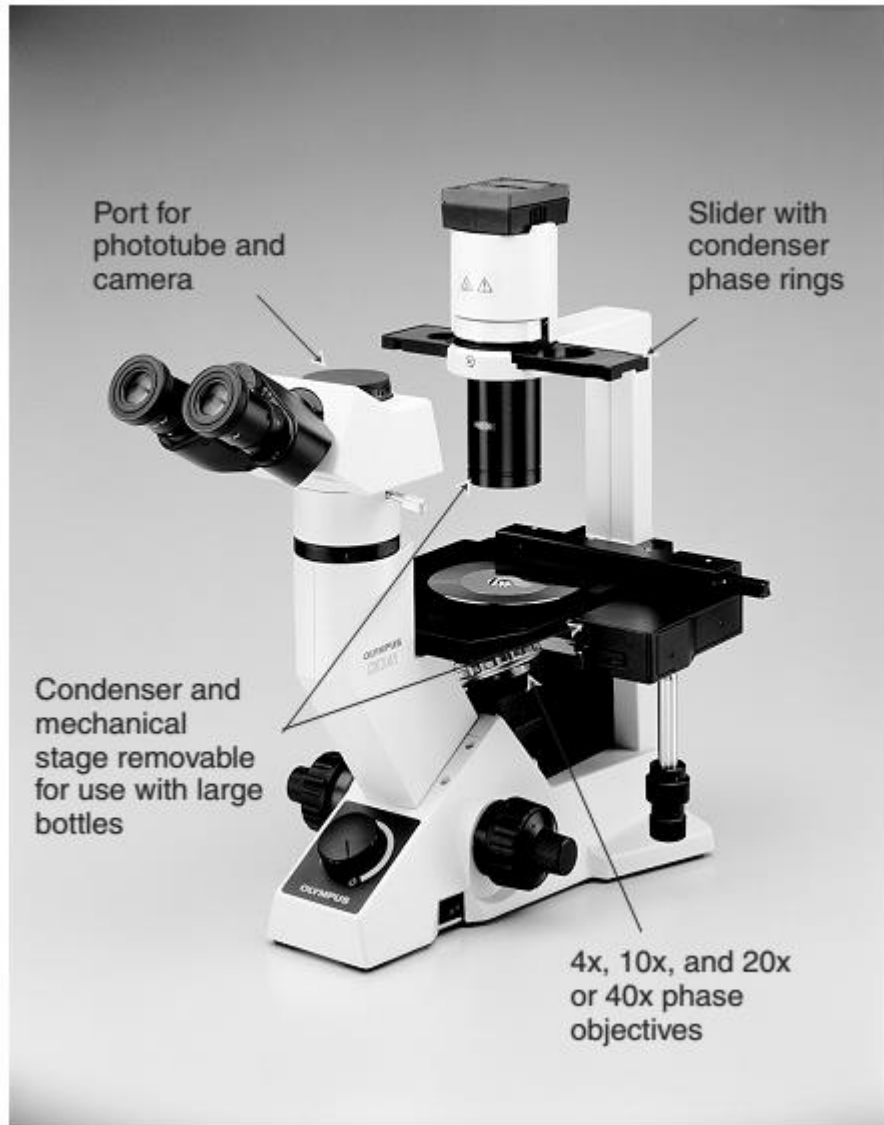


**Fig. 5.16. CO<sub>2</sub> Incubator Design.** Front view of control panel and section of chamber of two stylized humid CO<sub>2</sub> incubators. (a) Water-jacketed with circulating fan. (b) Dry-walled with no circulating fan (not representative of any particular makes).

میزان پیشنهادی CO<sub>2</sub> در انکوباتورها با محیط های مختلف

Bicarbonate in medium (mM)	Recommended CO <sub>2</sub> level in gas phase	Example of medium
4	atmospheric	Hank's BSS
26	5%	RPMI 1640
44	10%	DMEM

# Inverted Microscope



■ بررسی کشت سلول در فواصل منظم، جهت مانیتور سلامت و رشد سلول ها:

تغییرات مورفولوژیکی، اولین نشانه تخریب کشت است.  
تشخیص آسان الگوی آلودگی میکروبی

■ مشاهده سلول ها در فلاسک یا حتی بطری های استوانه ای به علت:

طراحی منبع نور در بالا  
فاصله عمل طولانی عدسی محدب

# Osmometer



**Fig. 9.1. Osmometer.** Roebing osmometer (Camlab) showing front panel, sample tube, and sample port. This model accepts samples of 50  $\mu$ L.

- یک پارامتر مهم محیط کشت سلولی، فشار اسمزی است که با اسمولاریته یا اسمولالیته بیان می شود.
- اسمولاریته کلی به تجزیه ماده بستگی دارد.
- اسمولاریته محیط کشت استاندارد تقریباً ۳۰۰ mOs/l است.
- اسمولاریته محیط کشت در طول رشد سلول به علت تولید متابولیت هایی با وزن مولکولی پایین مانند آمونیاک و اسیدلاکتیک افزایش می یابد.
- نوع متداول اسمومترها بر اساس نقطه انجماد مایع طراحی شده است: هنگامی که تعداد کل ذرات یونی و غیر یونی زیاد می شود، نقطه انجماد پایین تر می رود.
- در اسمولاریته بالا، کارایی چسبیدن سلول ها شدیداً افت می کند، درحالیکه کاهش اسمولاریته منجر به کاهش رشد می شود.

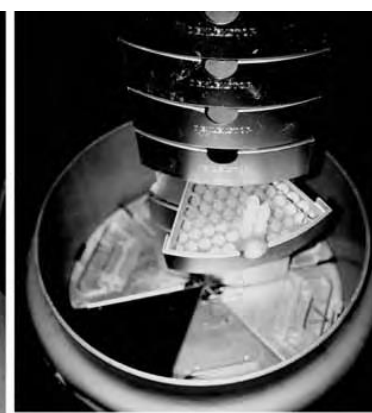
## Glassware Washing Machine



- The pump that forces the water through the jets should
- have a high delivery pressure, depending on the size of the machine.
  
- Water for washing should be heated to a minimum of 80°C.
  
- There should be a facility for a deionized water rinse
- at the end of the cycle. This should be heated to
- 50–60°C.

*Fig. 5.21. Glassware Washing Machine.* Glassware is placed on individual jets, which ensures thorough washing and rinsing (Betterbuilt).

# Cryopreservation





# Cryopreservation

