



مروری بر تکنیک‌های پایه کشت سلول و کاربردهای اختصاصی آن

*An Overview of Basic Technique and Specialized
Applications of Cell Culture*

نویسندگان:

دکتر کبری امیدفر

دکتر ملیحه پاک‌نژاد

دکتر سهیلا کاشانیان

دکتر محمد رضا استاد علی

با همکاری:

خانم فاطمه سادات امجد زنجانی

هوان و نام پدیدآور: مروری بر تکنیکهای پایه کشت سلول و کاربردهای اختصاصی آن/ نویسندگان: کبری امیدفر... و دیگران؛ با همکاری فاطمه سادات امجدزنجانی..

مشخصات نشر: تهران: ویستا؛ دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، ۱۳۹۰.

مشخصات ظاهری: ۱۳۸ ص: مصور (بخشی رنگی).

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۲۹۹۷-۵۸-۹

وضعیت فهرست نویسی: فیا

یادداشت: نویسندگان: کبری امیدفر، ملیحه پاکنژاد، سهیلا کاشانیان، محمدرضا استادعلی.

یادداشت: واژه نامه.

موضوع: یاخندها - کت

شناخته افزوده: امیدفر، کبری

شناخته افزوده: امجدزنجانی، فاطمه سادات، ۱۳۶۳ -

شناخته افزوده: دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم

رده بندی کنگره: ۱۳۹۰ QH ۵۵۵/۲۰۴

رده بندی دیویی: ۵۷۱/۶۳۸

شماره کتابشناسی ملی: ۲۰۱۴۰۵۲

نام کتاب:	مروری بر تکنیکهای پایه کشت سلول و کاربردهای اختصاصی آن
تألیف:	دکتر کبری امیدفر و همکاران
ناشر:	ویستا
مدیر اجرایی:	آزاده هاشمی
ویراستار:	فاطمه سادات امجد زنجانی
نویت چاپ:	چاپ اول
شمارگان:	۵۰۰ نسخه
لیتوگرافی، چاپ و صحافی:	سعید دانش
بها:	۵۰۰۰ ریال

سال چاپ: ۱۳۹۰

پژوهشکنده علوم غدد و متابولیسم، دانشکده علوم پزشکی تهران: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، کدپستی: ۱۴۱۱۲، تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

حق چاپ محفوظ است

شابک: ۹۷۸-۹۶۴-۲۹۹۷-۵۸-۹

ISBN: 978-964-2997-58-9



بسم الله الرحمن الرحيم

همکاری علوم پایه و بالینی راه اصلی در تحقیقات آینده پزشکی است. تلاش‌های متعدد و سیاست علمی در این بخش طراحی نقشه راهی است که بتواند علوم پایه و بالینی را با هم همراه سازد. این کار باعث عمق و دقت افزون تر در تحقیقات بالینی و همچنین یافتن کاربردهای بالینی برای تحقیقات پایه میشود.

امروزه با استفاده از فناوریهای سلولی شناسایی تغییرات ایجاد شده در سلول‌ها، مایعات بیولوژیک و ارزیابی درمان بیماریها و بسیاری از ناشناخته‌های دیگر علوم پزشکی توسط دانشمندان کشف و مورد بررسی قرار گرفته است. سال‌های اخیر شاهد رشد چشم گیر این فناوریها بوده به ترتیبی که محققان توانسته‌اند حتی تغییرات کوچک در سلول را مورد شناسایی و ارزیابی قرار دهند.

در این کتاب سعی ما بر این است که ابتدا با توجه به نقش بارز تکنیکهای سلولی، توانایی این تکنیکها را در تشخیص بالینی بیماریها نزد کلیه محققین علوم پایه و پزشکی و ضرورت داشتن اطلاعات بیشتر در خصوص توانایی این تکنیکها و هم چنین کاربرد وسیع آن در تشخیص بالینی نمایان سازیم. امید است که بتواند باعث آشنایی بیشتر محققان و دانشجویان با علم سلولی گردد.

دکتر باقر لاریجانی

رئیس پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم

نام خدا

دانش کشت سلولی علم سابقه داری است که از دیر باز مورد توجه محققین علوم مختلف بویژه ایمونولوژی، بیوشیمی، ژنتیک و زیست شناسی بوده و همواره در جهت شناسایی ناشناخته‌ها در سطح مولکول همراه با علوم دیگر کمکی به پیشرفت این علوم در سطح یاخته کرده است.

امروزه با استفاده از این فناوری شناسایی تغییرات ایجاد شده در سلول و داخل سلولی و ارزیابی درمان بیماری‌ها تسويع گردیده است. سال‌های اخیر شاهد رشد چشم‌گیر این فناوری‌ها بوده به ترتیبی که محققان توانسته‌اند حتی تغییرات کوچک در سلول را مورد شناسایی و ارزیابی قرار دهند. نیاز به علم کشت سلول در آینده محسوس‌تر خواهد شد زیرا اقتصاد کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه در آینده نزدیک وابسته به پیشرفت علم سلولی و مولکولی و کاربرد فرآورده‌های متنوع آن خواهد بود.

لذا در این کتاب سعی ما بر این است که ابتدا تکنیک‌های مختلف کشت سلولی را به صورت ساده و روان برای خواننده بیان کرده، توانایی این تکنیک‌ها را در تشخیص بالینی بیماری‌ها نزد کلیه پژوهشگران علوم پایه و بالینی مشخص کرده و ضرورت داشتن اطلاعات بیشتر در خصوص توانایی این تکنیک‌ها و هم چنین کاربرد وسیع آن در تشخیص بالینی نمایان سازیم. امید است که توانسته باشیم رضایت خاطر شما همکاران را با این مجموعه فراهم کرده و باعث آشنایی بیشتر محققان و دانشجویان با علم سلولی گردیم.

دکتر کبری امیدفر

فهرست

فصل ۱: فناوری کشت سلول و کاربرد آن در تحقیقات بالینی.....	۱
۱-۱ کشت سلول.....	۱
۲-۱ تاریخچه.....	۲
۳-۱ انواع کشت سلول.....	۳
۱-۳-۱ کشت سلول‌های گیاهی.....	۴
۲-۳-۱ کشت سلول‌های حیوانی.....	۵
۳-۳-۱ کشت سلول‌های بنیادی.....	۵
۱-۳-۳-۱ سلول‌های بنیادی جنینی.....	۸
۲-۳-۳-۱ سلول‌های بنیادی بالغ.....	۹
۳-۳-۳-۱ سلول‌های بنیادی خون بند ناف.....	۱۱
۳-۱ کاربردهای تکنولوژی کشت سلول.....	۱۱
۱-۳-۱ کاربرد درمانی.....	۱۱
۱-۱-۴-۱ تولید پروتئین‌های نوترکیب.....	۱۱
۲-۱-۴-۱ سلول درمانی.....	۱۲
۳-۱-۴-۱ مهندسی بافت.....	۱۳
۴-۱-۴-۱ واکسن.....	۱۳
۲-۳-۱ کاربرد تشخیصی.....	۱۴
۱-۲-۳-۱ ایمونوسیتوشیمی.....	۱۴
فصل ۲: سترون‌سازی.....	۲۱
۱-۲ سترون‌سازی.....	۲۱
۲-۲ تأثیر مواد ضد میکروبی.....	۲۱
۱-۲-۲ تأثیر عوامل فیزیکی بر روی میکروارگانیسم‌ها.....	۲۲
۱-۱-۲-۲ تشعشعات یونیزه کننده.....	۲۲
۲-۱-۲-۲ تشعشع ماوراء بنفش (UV).....	۲۳
۳-۱-۲-۲ دمای مرطوب.....	۲۶
۴-۱-۲-۲ دمای خشک.....	۲۸
۵-۱-۲-۲ سرما.....	۲۸
۶-۱-۲-۲ فشار.....	۲۹
۲-۲-۲ عوامل شیمیایی مؤثر بر روی میکروارگانیسم‌ها.....	۳۰
۱-۲-۲-۲ تأثیر عوامل شیمیایی بر روی دیواره سلولی و غشاء خارجی باکتری.....	۳۰
۲-۲-۲-۲ عوامل ضد باکتریایی مؤثر بر غشاء.....	۳۲

- ۳۳..... ۲-۲-۲ عوامل مؤثر بر اسیدهای نوکلئیک
- ۳۳..... ۲-۲-۲ عوامل شلاته کننده
- ۳۵..... ۲-۲-۲ ترکیبات شیمیایی اثرگذار بر اسپورها
- ۳۶..... ۳-۲ مکانیزم مواد ضد قارچ
- ۳۷..... ۳-۲ مکانیزم مواد ضد ویروس

فصل ۳: امکانات و تجهیزات اصلی در کشت سلول

- ۳۹..... ۱-۳ محیط کار استریل
- ۴۰..... ۲-۳ وسایل انکوباسیون
- ۴۱..... ۳-۳ یخچال و فریزر -20°C
- ۴۱..... ۴-۳ میکروسکوپ
- ۴۲..... ۵-۳ ظروف کشت بافت
- ۴۲..... ۶-۳ شستشو و استریلیز کردن وسایل
- ۴۳..... ۷-۳ نیتروژن مایع و فریزر -70°C
- ۴۳..... ۸-۳ سیستم اسمزی معکوس
- ۴۳..... ۹-۳ استریلیزاسیون فیلتری
- ۴۳..... ۱۰-۳ امکانات شمارش سلول ها
- ۴۴..... ۱۱-۳ سایر تجهیزات مورد نیاز

فصل ۴: آماده سازی و انتخاب محیط کشت

- ۴۵..... ۱-۳ محیط های کشت سلول های جانوری
- ۴۹..... ۲-۳ مواد تشکیل دهنده سرم
- ۴۹..... ۱-۲-۴ فاکتورهای رشد
- ۴۹..... ۲-۲-۴ هورمون ها
- ۴۹..... ۳-۲-۴ فاکتورهای اتصال و گسترش
- ۵۰..... ۴-۲-۴ پروتئین های اتصالی یا حامل
- ۵۰..... ۵-۲-۴ چربی ها
- ۵۰..... ۶-۲-۴ مواد معدنی
- ۵۰..... ۷-۲-۴ آنتی پروتئازها
- ۵۱..... ۸-۲-۴ ویسکوزیته
- ۵۱..... ۳-۳ مزایا و معایب استفاده از سرم در کشت سلول
- ۵۱..... ۴-۳ انواع محیط های پایه
- ۵۳..... ۵-۳ تهیه محیط کشت و مواد لازم جهت کشت سلول های هیبریدوما
- ۵۳..... ۱-۵-۲ طرز تهیه محیط کشت RPMI-1640
- ۵۵..... ۲-۵-۲ طرز تهیه محلول $100\times$ HT
- ۵۵..... ۳-۵-۲ طرز تهیه محلول $100\times$ HAT
- ۵۵..... ۴-۵-۲ محلول کلرید آمونیم جهت تجزیه گلبول های قرمز

۵۵	۵-۵-۲ طرز تهیه محیط همولیتیک Gey's
۵۷	۶-۵-۲ طرز تهیه PEG (۵۰٪ حجمی - حجمی)
۵۷	۶-۲ سلول هیبریدوما تولید کننده آنتی بادی منوکلونال

۵۹	فصل ۵: انجماد و کشت مجدد سلول‌ها
۶۰	۱-۵ ایجاد بانک سلولی
۶۱	۲-۵ اصول انجماد سلول‌ها
۶۲	۳-۵ نحوه انجماد سلول‌ها
۶۵	۴-۵ ذوب سلول‌های منجمد
۶۵	۵-۵ ملاحظات ایمنی هنگام ذوب کردن
۶۷	۶-۵ تداوم ذخیره

۶۹	فصل ۶: پاساژ دادن سلول‌ها
۶۹	۱-۶ پاساژ سلول‌های چسبنده
۷۳	۲-۶ پاساژ سلول‌های شناور

۷۵	فصل ۷: روش‌های کشت سلول
۷۷	۱-۷ انواع روش‌های کشت سلول
۷۷	۱-۱-۷ کشت اولیه سلولی یا کشت اولیه ریز نمونه
۷۷	۲-۱-۷ رده‌های سلولی نامیرا
۷۸	۳-۱-۷ کشت عضو
۷۹	۲-۷ روش کشت اولیه سلول‌ها
۷۹	۱-۲-۷ جداسازی بافت از موجود زنده
۸۰	۲-۲-۷ مجزا نمودن سلول‌های درون بافت
۸۲	۳-۷ فیبرهای موجود در بافت همبند
۸۲	۱-۳-۷ فیبرهای کلاژن
۸۳	۲-۳-۷ فیبرهای رتیکولار
۸۳	۳-۳-۷ فیبرهای الاستیک
۸۳	۴-۷ مولکول‌های چسبنده
۸۳	۵-۷ آنزیم‌های مورد استفاده در تجزیه آنزیمی
۸۴	۱-۵-۷ آنزیم‌های کلاژناز
۸۵	۱-۱-۵-۷ انواع کلاژنازها
۸۶	۲-۱-۵-۷ کلاژنازهای باکتریایی
۸۶	۳-۱-۵-۷ کلاژنازهای پستانداران
۸۷	۲-۵-۷ تریپسین
۸۷	۳-۵-۷ الاستاز

۸۸	۴-۵-۷ میالورونیداز
۸۸	۵-۵-۷ پاپائین
۸۸	۶-۵-۷ کیموتریپسین
۸۹	۷-۵-۷ دزوکسی ریبونوکلئاز
۸۹	۸-۵-۷ پروتئاز های خنثی
۸۹	۶-۷ کشت تحت شرایط استاندارد
۹۰	۷-۷ تهیه بافت تازه به منظور تولید رده ثابت
۹۰	۱-۷-۷ بافت جامد
۹۰	۲-۷-۷ بافت نرم و سیال و مایعات بدن
۹۱	۸-۷ تهیه کشت اولیه سلولی
۹۲	۹-۷ تهیه لایه تغذیه ای
۹۳	۱۰-۷ کشت سلول های معلوما
۹۵	فصل ۸: نشان دار کردن ایمونوسیتوشیمی
۹۸	۱-۸ نشان دار کردن ایمونوبلوزینی غیر مستقیم بر روی سلول های چسبنده
۱۰۲	۲-۸ روش نشان دار کردن آنتی ژن های سطح سلول های زنده
۱۰۲	۳-۸ نشان دار کردن سلول های شکار
۱۰۳	۴-۸ انجام سنجش ایمنی روی آنتی ژن های سطح سلول
۱۰۳	۵-۸ روش ایمونواسی غیر مستقیم
۱۰۵	فصل ۹: آلودگی های کشت سلول
۱۰۵	۱-۹ آلودگی های میکروبی
۱۰۷	۱-۱-۹ میکوپلاسما
۱۰۸	۲-۱-۹ باکتری ها
۱۰۹	۳-۱-۹ قارچ ها
۱۱۰	۴-۱-۹ مخمر ها
۱۱۱	۵-۱-۹ ویروس ها
۱۱۲	۲-۹ منابع آلودگی
۱۱۳	۳-۹ جلوگیری از ایجاد آلودگی های میکروبی و استفاده از آنتی بیوتیک ها
۱۱۳	۴-۹ دستور العمل اصلی برای از بین بردن آلودگی موجود در کشت ها
۱۱۳	۵-۹ آلودگی رده های سلولی به یکدیگر
۱۱۷	فصل ۱۰: فلوسایتومتری
۱۱۸	۱-۱۰ اجزای دستگاه فلوسایتومتری
۱۱۸	۱-۱-۱۰ اجزای نوری
۱۲۲	۲-۱-۱۰ سیستم سیالات

- ۱۲۵..... ۳-۱-۱۰ پردازش سیگنال‌ها.
- ۱۲۶..... ۴-۱-۱۰ پردازش داده‌ها.
- ۱۲۶..... ۵-۱-۱۰ نمایش اطلاعات.
- ۱۲۹..... ۲-۱۰ کاربردهای فلوسایتومتری.
- ۱۲۹..... ۱-۲-۱۰ شناسایی سلول‌ها.
- ۱۳۰..... ۲-۲-۱۰ جداسازی جمعیت‌های سلولی خاص.
- ۱۳۰..... ۳-۲-۱۰ آنالیز DNA سلولی.
- ۱۳۰..... ۴-۲-۱۰ شمارش سلول‌های CD34⁺.
- ۱۳۱..... ۵-۲-۱۰ بررسی عملکرد سلول‌ها و پاسخ آن‌ها به عوامل گوناگون.
- ۱۳۱..... ۶-۲-۱۰ میکروپزشناسی و انگل‌شناسی.
- ۱۳۱..... ۷-۲-۱۰ بیوتکنولوژی.
- ۱۳۱..... ۸-۲-۱۰ تعیین غلظت مولکول‌ها.
- ۱۳۵..... ۳-۱۰ نحوه انجام فلوسایتومتری.
- ۱۳۸..... ۴-۱۰ شمارش نوع خاصی از سلول‌ها.
- ۱۳۸..... ۵-۱۰ بررسی اتصال آنتی‌بادی به گیرنده سطح سلول با استفاده از دستگاه FACS.

www.ketaboo.ir