کشت سلولی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

CELL CULTURE

Instructor:

Dr Ostad & Dr Ghahremani

Iranpuyesh.ir

فهرست

کاور ۱

جلسه اول ۷

مقدمات کشت سلولی ۷

مزایای این روش ۷

معایب این روش ۸

کشت سلولی ۸

۱- Primary cells ۸

روش های جداسازی ۸

۱- Explant Culture ۸

۲- Enzymatic dissociation ۸

۲- Cell strains ۹

۳- Cell line ۹

انواع رشد ۹

۱- Anchorage dependent ۹

۲- Anchorage independent ۹

چرخه رشد ۱۰

مورفولوژی سلول ها ۱۰

جلسه دوم ۱۱

لوازم و مهارت های آزمایشگاهی پایه برای آزمایشگاه کشت سلولی ..۱۱

۱- ابزار های مورد نیاز ۱۱

۲- تکنیک های استریل کار کردن ۱۱

۳- استفده از مواد و ریجنت ها ۱۲

۴- استفاده از مهارت ها و تکنیک های ضروری.....۱۲
دشمن های کشت سلولی.....۱۲
ایمنی.....۱۳
ابزارهای کشت سلولی.....۱۳
۱- لامینارهای کشت سلولی.....۱۳
۲- انکوباتور CO۲.....۱۳
رشد سلولی.....۱۴
انواع کشت سلولی.....۱۴
محیط های کشت.....۱۵
میزان حلالیت اکسیژن در محیط کشت.....۱۶
جلسه سوم.....۱۷
ذخیره کردن در محیط کشت.....۱۷
مراحل فریز کردن.....۱۷
ظروف کشت سلولی.....۱۸
اندازه گیری حیات و سمیت سلول ها.....۱۹
انواع تست های سمیت.....۲۰
۱- Short term assay.....۲۰
۱) Dye exclusion viability test.....۲۰
۲) Dye uptake.....۲۰
۳) ترکیبات کروم ۵۱.....۲۰
۴) سایر تست ها.....۲۰
۲- Long term assay.....۲۰
۱) Clonogenic assay.....۲۰

روش های غیر مستقیم (۲) ۲۱
جلسه چهارم ۲۲
سلول های بنیادی جنینی ۲۲
سلول های بنیادی ۲۲
انواع سلول های بنیادی ۲۲
۱) Totipotent ۲۲
۲) Pluripotent ۲۳
۳) Multipotent ۲۳
ویژگی های سلول های بنیادی ۲۳
منابع سلول های بنیادی ۲۳
۱) Adult stem cells (ASC) ۲۳
۲) Embryonic stem cells ۲۴
۳) Embryonic germ cells ۲۴
۴) Induced pluripotent cells (iPs cells) ۲۴
مقایسه سلول های بنیادی و سلول های بالغ ۲۴
تاریخچه تحقیقات ESC ۲۴
اهمیت ESC ۲۴
Express embryos from IVF clinics ۲۵
تاریخچه Stem cells ۲۵
جلسه پنجم ۲۶
آپوپتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلول ها ۲۶
کاربرد کشت سلول ها ۲۶
Apoptosis ۲۶

عوامل القاءکننده آپوپتوز ۲۷
تفاوت آپوپتوز و نکروز ۲۷
اتوفاژی ۲۸
مسیرهای دخیل در آپوپتوز ۲۸
۱- مسیر خارجی ۲۸
۲- مسیر داخلی ۲۸
کنترل آپوپتوز ۲۹
بیماری های ناشی از آپوپتوز ۲۹
بررس آزمایشگاهی آپوپتوز ۲۹
جلسه ششم ۳۰
چرخه سلولی ۳۰
نحوه عمل Cdk & Cyclin ۳۲
بررسی فاز سلول ها ۳۲
DNA damage checkpoint ۳۳
جلسه هفتم ۳۴
دستکاری سلول ها ۳۴
چطور یک سلول را نامیرا کنیم ۳۴
۱) Simian Virus ۳۴
۲) Papilloma Virus (HPV) ۳۴
۳) ویروس سرماخوردگی ۳۵
۴) Ebstein Bar Virus (EBV) ۳۵
۵) اضافه کردن ناحیه تلومر به سلول ها ۳۵

۶) Cell Fusion ۳۵
فیوز کردن سلول ها ۳۵
۱- استفاده از ویروس سندای ۳۵
۲- PEG ۳۵
Genetic Modification of Cells ۳۶
روش های متداول برای دستکاری ژنتیکی ۳۶
۱- infection ۳۶
۲- injection ۳۶
۳- Transfection ۳۷
۱. روش فسفات کلسیم ۳۷
۲. استفاده از لیپید ها ۳۷
۳. استفاده از برق ۳۷
جلسه هشتم ۳۸
بررسی پاسخ های سلولی و آنالیز های بیوشیمیایی ۳۸
مطالعات نسخه برداری و ترجمه ۳۸
روش های انازه گیری mRNA ۳۸
بررسی در سطح ترجمه ۳۸
روش های اندازه گیری سطوح پروتئین ۳۸
Secondary Messengers ۳۹
بررسی مواد ترشح شده ۴۰
اندازه گیری آنزیم ها ۴۰
Phosphorylation ۴۱
تداخلات پروتئینی ۴۲
روش های اندازه گیری DNA-Protein Interaction ۴۲

به نام هستی بخش

جلسه: اول	**استاد:** دکتر استاد
گروه جزوه کشت سلولی	**تهیه و پیاده‌سازی ویس:** یزدان مرادی
تایپیست: سجاد عظیمی	**ویراستار:** فاطمه ارتیشدار
سرفصل‌ها : انواع سلول‌ها - مقدمات کشت‌سلولی	iranpuyesh.ir

مقدمات کشت سلولی

امروزه با توجه به گذشت دوران و به وجودآمدن حقوق حیوانات، استفاده از حیوانات در تحقیقات کاهش‌یافته و روش‌های سلولی- مولکولی جایگزین آن شده‌اند.کشت سلولی با کارهای آقای هاریسون شروع شد. وی از حیوانات خونسرد (چون انکوباتور کربن دی‌اکسید در دسترس نبود.) استفاده می‌کرد، اندام‌ها و سلول‌های آن‌ها را جدا کرده، کشت داده (روش in vitro، در محیط‌هایی که خودش درست کرده بود) و زیر میکروسکوپ مشاهده می‌کرد.

- تا ۵۰ سال قبل این روش چندان مد نبود تا این که ویروس‌ها به وجود آمدند و واکسن‌ها تهیه شدند و بررسی‌های in vitro اهمیت پیدا کردند.
- موضوعات مورد بحث در کشت سلولی عبارتند از:
  - Intracellular activity ← مثل تاثیر متابولیسم داروها بر DNA
  - Intracellular flux ← مثل RNAها، میزان و تاثیر هورمون‌ها و متابولیت آن‌ها
  - Environmental interaction (فعل و انفعالات محیطی) ← مثل سرطان، عفونت‌های ویروسی، اثرات داروها
  - Cell- cell intraction (فعل و انفعالات بین سلولی) ← مثل بررسی embryonic induction (مشکلات جنینی) ، contact inhibition (جلوگیری از ارتباط) و invasion (تهاجم)
  - Cell product (محصولات سلولی) ← مانند: اگزوسیتوز و بیوتکنولوژی (ترکیبات GCFF که از سلول‌های پستانداران تهیه می‌کنیم.)
  - Genetics (ژنتیک سلولی)← انتقال و آنالیز ژنتیکی

- **مزایای این روش:**

۱) رساندن دارو یا مادهٔ مورد نظر دقیقا به site موردنظر است. وقتی دارویی را مستقیما به موش تزریق می‌کنیم، نمی‌توانیم ۱۰۰٪ مطمئن باشیم دارو به منطقه‌ی موردنظر رسیده باشد. در این موارد مجبوریم از یک جامعهٔ آماری استفاده کنیم که باز هم خطاهایی دارد. در نتیجه همیشه نمی‌توان از آمار استفاده کرد.

۲) توانایی ایجاد شرایط همگن

۳) می‌توان شرایط محیط کشت را کنترل کرد.

۴) میزان دارو و مواد وارد شده را می‌توان **دقیق** اندازه‌گیری و بررسی کرد.

۵) در شرایط مناسب، امکان تکرارپذیری آزمایشات نیز وجود دارد.

۶) می‌توان کشت را در مقابله با مواد radio-chemical قرار داد. (البته در غلظت مشخص شده) به طور مثال برای داروهایی که therapeutic index خیلی باریکی دارند.

۷) از نظر اخلاقی مناسب است و حقوق حیوانات نیز رعایت می‌شود.

- **عیب‌های این روش:**

۱) تکنیک‌های آن باید استاندارد شده باشد.

۲) همچنین تکنیک‌ها و وسایل باید ضدعفونی (aseptic) باشند. درنتیجه قیمت ظروف و مواد بسیار بالاتر است.

۳) میزان سلولی که کشت می‌دهیم در مقایسه با یک حیوان پرسلولی، کمتر است.

۴) از دیگر معایب آن dedifferentiation (عدم تمایززدایی) و selection (انتخاب) است.

- Dedifferentiation، زمانی است که سلول نتواند کار اصلی خود را انجام دهد. برخی با ورود به محیط کشت، می‌میرند و برخی نیز استانداردهای زندگی خود را پایین آورده و به زندگی در محیط کشت ادامه می‌دهند. عدم تمایززدایی می‌تواند خوب یا بد باشد. اگر تحت نظر فرد موردنظر باشد مطلوب است ولی اشتباهات سبب خراب‌شدن کار می‌شود.
- در selection، ممکن است خواسته یا ناخواسته، جمعیت‌های مختلف سلولی را از هم جدا کنیم که البته جواب‌های متفاوت می‌دهند. اگر خواسته باشد، خوب است ولی ناخواسته باشد، جواب غلط است.

کشت سلولی(Tissue & Cell culture):

اسم عمومی برای جدا کردن سلول از بدن یک حیوان یا گیاه (موجود پرسلولی) و قرار دادن در محیط مصنوعی بیرون و **تکثیر** آن (حداقل ۲ بار) در خارج از بدن است. علت آن است که تنها سلول‌هایی باقی می‌مانند که قابلیت تکثیر و زندگی در بیرون از بدن را دارند. برای کشت سلولی به یک محیط و ظرف نیاز داریم. هم‌اکنون برای کشت سلولی، اکثرا از سلول‌های پستانداران انسانی یا غیرانسانی استفاده می‌شود.

- در کشت سلولی ۳ نوع سلول داریم:

۱) primary cells: (سلول‌های عمردار)

✓ سلول ها با جراحی یا به صورت آنزیماتیک از بافت اصلی جدا شده‌اند و کشت داده می‌شوند.

✓ ویژگی‌های سلول‌ها در این روش:

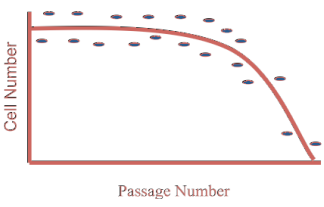
۱. سلول‌ها مستقیما از بافت اصلی جدا شده‌اند. بنابراین بیشترین شباهت را به بافت اولیه دارند. البته کاملا هم شبیه نیست، چون مثلا در بافت اصلی سلول‌ها می‌توانند در سه بُعد رشد کنند؛ در حالی که در محیط کشت، تنها در دو بعد رشد می‌کنند. در نتیجه رفتارها با هم متفاوت است.

۲. جمعیت حاصل از این کشت هتروژن است و می‌توانند سلول‌های متفاوت با رفتارهای متفاوت باشند. همچنین بیش از ۵ تا ۱۰ بار رشد نمی‌کنند (عمر محدود) و وارد فاز آپوپتوز (death phase) می‌شوند. پس شمارهٔ کشت اهمیت دارد. اگر در پاساژدادن‌ها دقت کافی نکنیم، سلول ها از هم جدا (Selection) می‌شوند.

✓ برای جدا کردن primary cultureها دو روش داریم:

۱- **Explant culture**: بافت‌ها با حجم بسیار کم (۰٫۱ میلی‌متر مکعب) جدا می‌شوند. آن‌ها را ریز کرده و در شرایط مناسب (اکسیژن و کربن دی‌اکسید کافی) به مدت یک هفته در محیط کشت قرار می‌دهند و سلول‌ها در محیط در دو بعد overgrowth می‌کنند. در پایان سلول‌ها به کف محیط چسبیده‌اند و می‌توان از آن استفاده کرد. عیبی که این روش دارد این است که سلول‌هایی overgrowth می‌کنند که رشد خیلی سریعی دارند نه همهٔ سلول‌ها. بنابراین در این مرحله، نوعی selection انجام می‌شود.

۲- **Enzymatic dissociation**: در روش‌های معمولی نمی‌توان از روش بالا استفاده کرد؛ زیرا وقت‌گیر است. به جای آن، قسمتی از بافت را جدا کرده، آنزیم‌های مختلف (EDTA، تریپسین، کلاژناز و ..) اضافه شده، سلول‌ها براساس نوع‌شان از هم جدا شده، شست و شو داده شده، در محیط سوسپانسیون شده و کشت داده می‌شوند. این روش زمان کمتری می‌برد و راحت‌تر سلول‌ها جدا می‌شوند.



✓ در سلول‌های primary پدیده‌ای به نام Hayflick's phenomenon وجود دارد. وقتی سلول‌ها را زیاد پاساژ دهیم، می‌میرند.