بسم الله الرحمن الرحيم

کشت سلول Cell Culture

دکتر سیده زهرا مطلوبی

دکتری ایمنی شناسی

استادیار دانشکده پزشکی

دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

مقدمات کشت

- **تعریف: تکثیرو بقا سلول‌ها در یک محیط مصنوعی را کشت سلول می‌گویند.**

انواع سلول ها:

۱- سلول های نامیرا (مانندسلول های سرطانی)

۲- سلول های اولیه (Primary)

۳- سلول های بنیادی (STEM Cell)

مقدمات کشت

- **مواد لازم برای کشت سلول:**

۱- محیط کشت.

۲- سرم جنین گوساله (FBS) یا سرم جنین اسب (HBS).

۳- آنتی بیوتیک.

۴- فلاسک یا پلیت.

۵- هود لامینار.

۶- انکباتور CO2.

۷- میکروسکوپ اینورت.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

محیط کشت پایه: حاوی آمینواسیدها، ویتامین‌ها، نمک‌های غیرآلی ،یون‌ها و منبع کربن نظیر گلوکز یا پیروات

انواع محیط‌های کشت:

۱- Basal medium Eagle (BME):

یک محیط غنی شده با حداقل ترکیبات مورد نیاز برای کشت سلول شامل ۱۳ آمینواسید و۸ ویتامین است.

۲- MEM (EMEM):

نوعی BME می باشد که بر اساس نیاز سلول، غلظت اغلب آمینواسیدهای آن دو برابر افزایش یافته است. آمینواسیدهای غیرضروری که سلول ها می توانند آنها را بیوسنتز کنند در فرمولاسیون MEM بکار نرفته است.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

۳- Dulbecco’s modified MEM (DMEM):

نوعی BME می باشد که در آن غلظت آمینواسیدها و ویتامین ها ۴ برابر شده است. این محیط را با افزودن آمینواسیدهای غیرضروری به خصوص L-Glutamine، گلایسین، سرین، آهن وپیروات می توان غنی تر کرد. pH این محیط کشت توسط سیستم بافری بیکربنات سدیم تامین می گردد و بین ۶/۸ الی ۷/۴ است. در زمان کشت سلول های نیازمند به غلظت بالای گلوکز از DMEM با گلوکز بالا استفاده می گردد.

۴- α-MEM:

نوعی MEM تغییر یافته برای تحقیقات در زمینه کشت رده های سلولی هیبریدی در موش و همستر می باشد. این محیط نوعی MEM بوده که اسیدهای آمینه غیرضروری، ویتامین های آسکوربیک اسید، بیوتین و سیانوکوبالامین، پیروات، لیپوئیک اسید و نوکلئوتید ها به آن افزوده شده است.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

۵- Iscove’s modified DMEM (IMDM):

محیطی است غنی شده با چندین آمینواسید غیرضروری، ویتامین هایی نظیر سیانوکوبالامین و بیوتین، سلنیت و پیروات. همچینن در این محیط کشت از HEPES به عنوان فاکتوری جهت ثبات pH استفاده شده است. ترانسفرین، آلبومین سرم گاوی و لیپیدهای سویا به عنوان جایگزین سرم در ترکیب این محیط وجود دارند. از این رو در زمان کشت با این محیط نیازی به استفاده از FBS نیست.

۶- RPMI 1640:

این محیط بر پایه محیط McCoy’s 5A بوده و به منظور کشت طولانی مدت لنفوسیت های خون محیطی عرضه شد. مشخصه آن، سطوح پائین کلسیم ومنیزیم وسطوح بالای فسفات است. یکی از محیط های پرکاربرد در کشت های سوسپانسیونی نظیر سلول های خونی، لنفوسیت ها وهیبریدوماها است.به دلیل غلظت بالای نمک های فسفر در ترکیبت این محیط، pH آن حدود ۸ و بالاتر از DMEM است.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

۷- Leibovitz's L-15:

ظرفیت بافری در این محیط کشت به جای بیکربنات سدیم توسط فسفات ها وآمینواسیدهای بازی آزاد تامین می شود که سبب می گردد در زمان استفاده از آن، نیازی به انکوباتور CO2 دار نباشد. برای کنترل کاهش pH حاصل از CO2 تولید شده طی متابولیسم سلول ها، در ترکیب آن به جای گلوکز از پیروات استفاده شده است. این محیط دارای غلظت بسیار بالایی از تمامی انواع اسید های آمینه است.

۸- DMEM/F12.:

این محیط مخلوطی از DMEM وHam's F-12 بوده و یک محیط فوق العاده غنی و پیچیده است که از رشد طیف وسیعی از انواع سلول‌ها در فرمول‌های با سرم و بدون سرم پشتیبانی می‌کند. بافر HEPES در غلظت نهایی ۱۵ میلی مولار در فرمول گنجانده شده است تا جبرانی بر از بین رفتن ظرفیت بافری ناشی از حذف سرم باشد.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

به صورت یک قاعده کلی:

محیط کشت‌های α-MEM، DMEM و Ham’s F-12 برای کشت سلول‌های چسبنده

محیط کشت RPMI برای کشت سلول‌های سوسپانسیونی

و محیط کشت ترکیبی DMEM/F12 و L15 برای کشت‌های فاقد سرم از جمله سلول های بنیادی استفاده می‌شود.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

تنظیم pH محیط کشت:

حفظ pH برای رشد سلول¬ها بسیار حیاتی بوده و دامنه تغییرات قابل تحمل سلول بین ۷.۲ تا ۷.۴ است.

در محیط‌های کشت، CO_2 محلول در تعادل با یون‌های بیکربنات است: $H_2O + CO_2 \Leftrightarrow H_2CO_3 \Leftrightarrow H^+ + HCO_3$

بیکربنات سدیم اضافه شده به محیط سطح CO_2 را در محیط کشت طبق واکنش زیر تنظیم می¬کند:

$$H_2O + CO_2 + NaHCO_3 \Leftrightarrow H^+ + Na^+ + 2HCO_3^-$$

فنل رد تغییرات pH محیط را با تغییر رنگ خود نشان می¬دهد:

در سطوح پائین pH رنگ زرد، در سطوح بالای pH رنگ ارغوانی

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

رنگ¬های مختلف محیط کشت حاصل از تغییر pH و علل احتمالی آن¬ها

۱- رنگ زرد pH: 6.5

علت‌های احتمالی وراهکار:

- افزایش مواد زائد سلول‌ها در محیط وتجزیه پروتئین‌های سرم توسط آن‌ها واتمام مواد غذایی: محیط کشت سریعا تعویض شود.
- افزایش میزان CO2 انکوباتور: تنظیم فشار کپسول CO2
- آلودگی باکتریایی: فلاسک بدون باز کردن درب آن اوت گردد.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

رنگ¬های مختلف محیط کشت حاصل از تغییر pH و علل احتمالی آن¬ها

۲-رنگ متمایل به زرد pH: 7.0

علت¬های احتمالی وراهکار:

- رشد سلول‌ها به صورت طبیعی است ومواد غذایی در حال اتمام است. بنابراین سعی شود در اولین فرصت (کمتر از ۲۴ ساعت) محیط کشت تعویض گردد.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

رنگ¬های مختلف محیط کشت حاصل از تغییر pH و علل احتمالی آن¬ها

۳- رنگ قرمز روشن/نارنجی pH: 7.4

علت¬های احتمالی وراهکار:

- سلول‌ها وضعیت مناسبی داشته و همه شرایط مناسب است.

مقدمات کشت

۱- محیط کشت

رنگ¬های مختلف محیط کشت حاصل از تغییر pH و علل احتمالی آن¬ها

۴- رنگ ارغوانی pH: 7.8

علت¬های احتمالی و راهکار:

- کم بودن میزان CO2 انکوباتور: تنظیم فشار کپسول CO2
- زیاد بودن میزان بیکربنات محیط کشت: فرمولاسیون محیط کشت بررسی شده و محیط کشت دیگری استفاده شود.
- کم بودن میزان رطوبت انکوباتور و تبخیر محیط کشت: ظرف حاوی آب انکوباتور و حجم میزان محیط کشت بررسی شود.

در این وضعیت سلول‌ها رشد نکرده وپایداری این شرایط می‌تواند سبب ایجاد تغییرات در سلول‌ها شود.

مقدمات کشت

۲- سرم جنین گوساله (FBS)

برای منبع پروتئین‌هایی مانند آلبومین و هورمون‌ها ، فاکتوررهای رشد ، لیپید ها و همچنین تغذیه مناسب سلول‌ها از سرم (معمولا به دست آمده از خون جنین گوساله(FBS)) استفاده می‌شود.

مقدمات کشت

۳- آنتی بیوتیک

برای مهار رشد باکتری و یا قارچ به محیط کشت اضافه می¬گردند.

در زمان استفاده از FBS به دلیل مغذی بودن بالای محیط کشت احتمال آلودگی بسیار بالا است. پروتئین¬های درون محیط کشت می¬توانند سمیت آنتی¬بیوتیک را کنترل کنند در نتیجه افزودن آنتی¬بیوتیک مناسب و بی خطر است.

در محیط¬های کشت فاقد سرم احتمال رشد باکتری پایین بوده، همچنین ممکن است آنتی¬بیوتیک به سلول¬ها آسیب برساند در نتیجه توصیه می¬شود آنتی بیوتیک مورد استفاده قرار نگیرد.

مقدمات کشت

۳- آنتی بیوتیک

رایج ترین آنتی بیوتیک های استفاده شده در محیط کشت سلولی

۱- پنی سیلین و استرپتومایسین: معمولاً بصورت مخلوطی از پنی سیلین به مقدار ۱۰۰واحد در میلی لیتر (جلوگیری از رشد باکتری های گرم مثبت) و استرپتومایسین به مقدار ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر (جلوگیری از رشد باکتری های گرم منفی).

۲-جنتامایسین: در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر

۳- آنتی بیوتیک های با طیف گسترده: **کاناماسین**

۴- داروهای ضد قارچی نظیر **آمفوتریسین B**

۵- پلاسموسین: برای حذف آلودگی مایکوپلاسما

مقدمات کشت

۴- فلاسک و پلیت

جنس فلاسک : معمولا پلی استایرن Polystyrene، دارای بار مثبت

انواع فلاسک : فیلتر دار و ساده

حجم: فلاسک کوچک (T25) و فلاسک بزرگ (T75)

کاربرد: بسته به تعداد مورد نیاز سلول و آزمایش

مقدمات کشت

۴- فلاسک و پلیت

Dish Size	Volume (mL)/ flask or well	Growth Area (cm^2)
75 cm^2 flask	12	75
25 cm^2 flask	6	25
100 mm plate	10	56
60 mm plate	5	21
6-well plate	4	9.5
12-well plate	2	4
24-well plate	1	2
96-well plate	0.1	0.32

مقدمات کشت

۵- هود لامینار

۶- انکوباتور CO2 دار

۷- میکروسکوپ اینورت

مراحل کشت

۱- یخ زدایی

۲- تعویض محیط

۳- پاساژ دادن

۴- گرفتن بکاپ و نگه داری برای طولانی مدت

مراحل کشت

۱- یخ زدایی

خروج کرایو تیوب از تانک ازت و قرار دادن در فریزر ۸۰-

آماده کردن وسایل کشت شامل فلاسک، فالکون و استریل نمودن هود با استفاده از UV

گرم کردن محیط کشت و FBS با خارج کردن از یخچال

ریختن محلول محتوی محیط کشت/ FBS به نسبت ۱:۱ داخل فالکون 15mL در حجمی برابر با محتویات داخل کرایوتیوب

ریختن محتویات کرایوتیوب در داخل فالکون محتوی محلول محیط کشت/FBS به نسبت ۱:۱

مراحل کشت

۱- یخ زدایی

سانتریفیوژ کردن به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ توسط سانتریفیوژ های swing out

دور ریختن محلول رویی فالکون محتوی سلول (حاوی DMSO)

شستشوی مجدد سلول ها با یک میلی لیتر محیط کشت (بدون FBS) جهت حذف سلول های مرده و بقایای احتمالی DMSO

سانتریفیوژ مجدد به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰

دور ریختن محلول رویی سلول های درون فالکون و اضافه کردن ۱ میلی لیتر محیط جدید و سوسپانس کردن سلول ها در آن

مراحل کشت

۱- یخ زدایی

ریختن ۳/۲۵۰ میلی لیتر محیط حاوی ۱٪ آنتی بیوتیک در فلاسک کوچک همراه با ۰/۷۵۰ میلی لیتر FBS

افزودن محلول محتوی سلول درون فالکون (۱ میلی لیتر) به فلاسک

در این زمان در فلاسک کوچک ۵ میلی لیتر محلول وجود دارد که محتوی ۷۵۰ میکرولیتر FBS می باشد (۱۵٪).

علت: برطرف کردن شوک گرسنگی سلول جهت رشد بهتر در آغاز فرآیند کشت

قرار دادن فلاسک محتوی سلول در انکوباتور

مراحل کشت

۲- تعویض محیط

سلول سوسپانس:

ریختن تمام محیط کشت درون فلاسک داخل یک فالکون و شستن فلاسک با یک سی سی محیط کشت جدید و سپس افزودن آن به فالکون دارای محیط کشت فلاسک

سانتریفیوژ در دور ۱۵۰۰ و به مدت ۵ دقیقه

دور ریختن محیط و سوسپانس سلول ها در یک سی سی محیط جدید

مراحل کشت

۲- تعویض محیط

سلول سوسپانس:

اضافه کردن سلول ها به فلاسک حاوی ۵/۳ سی سی محیط و ۰/۷ سی سی FBS : در نهایت ایجاد محیط 7 سی سی حاوی ۱۰٪ FBS.

سلول چسبان :

خالی کردن محیط کشت و شستن فلاسک با ۱ الی ۲ سی سی بافر فسفات (PBS) و ریختن ۴/۵ سی سی محیط و ۰/۵ سی سی FBS در فلاسک

مراحل کشت

۳- پاساژ دادن

سلول سوسپانس:

مشابه تعویض محیط سلول ها جمع آوری و سانتریفیوژ شده سپس بعد از خالی کردن محیط رویی، سلول ها در **دو** سی سی محیط جدید سوسپانس می شوند.

آماده کردن دو فلاسک هر کدام حاوی ۵/۳ سی سی محیط و ۰/۷ سی سی FBS و سپس افزودن یک سی سی از فالکون حاوی سلول به هر کدام

مراحل کشت

۳- پاساژ دادن

سلول چسبان:

خالی کردن کامل محیط فلاسک و شستن سلول ها با یک سی سی(فلاسک کوچک) یا دو سی سی(فلاسک بزرگ) PBS

افزودن ۰/۷۵۰ الی ۱ سی سی (فلاسک کوچک) یا ۲ سی سی (فلاسک بزرگ) تریپسین به فلاسک

خالی کردن تریپسین بعد از حدود ۶۰ الی ۹۰ ثانیه (زمانی که در زیر میکروسکوپ سلول ها شروع به گرد شدن کرده باشند)

قرار دادن فلاسک خالی در انکوباتور به مدت ۵ دقیقه

مراحل کشت

۳- پاساژ دادن

سلول چسبان:

بعد از خارج سازی از انکوباتور با ضربه به فلاسک ریزش سلول ها قابل مشاهده است.

مرحله بعد : جمع آوری سلول ها به کمک محیط کشت و تقسیم در فلاسک های جدید

مراحل کشت

۳- فریز کردن و تهیه بکاپ

سلول های سوسپانس:

ریختن سلول ها در فالکون، سانتریفیوژ، دور ریختن محلول رویی، سوسپانس مجدد در میزان لازم FBS خالص

به ازای هر یک الی یک و نیم میلیون سلول میزان ۹۵۰-۹۰۰ لاندا FBS

ریختن در داخل کرایوتیوب به نسبت: ۹۵۰-۹۰۰ لاندا FBS + ۱۰۰-۵۰ لاندا DMSO

حجم نهایی در داخل هر کرایو حداکثر ۲ سی سی است. قرار دادن به مدت ۲۴ ساعت در فریزر -۸۰ و سپس انتقال به تانک ازت

مراحل کشت

۳- فریز کردن و تهیه بکاپ

سلول های چسبان:

خالی کردن محیط ، شستن فلاسک با بافر فسفات، افزودن تریپسین، خالی کردن تریپسین و قرار دادن در انکوباتور، ریزش سلول، جمع آوری سلول ها در میزان مورد نیاز FBS خالص

بقیه مراحل ونسبت ها مانند سلول سوسپانس است.

آلودگی های محیط کشت

تشخیص:

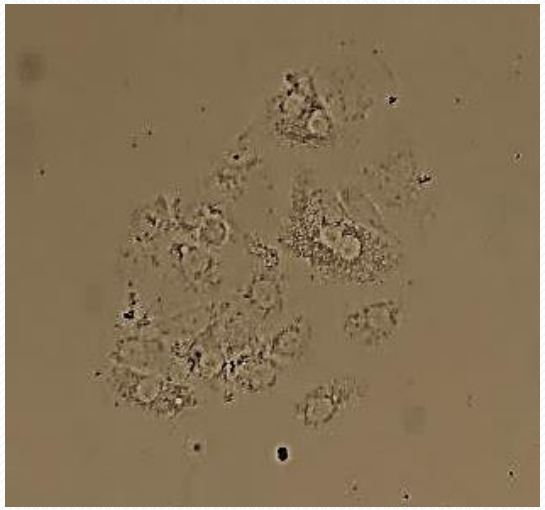
۱- کدر شدن محیط کشت

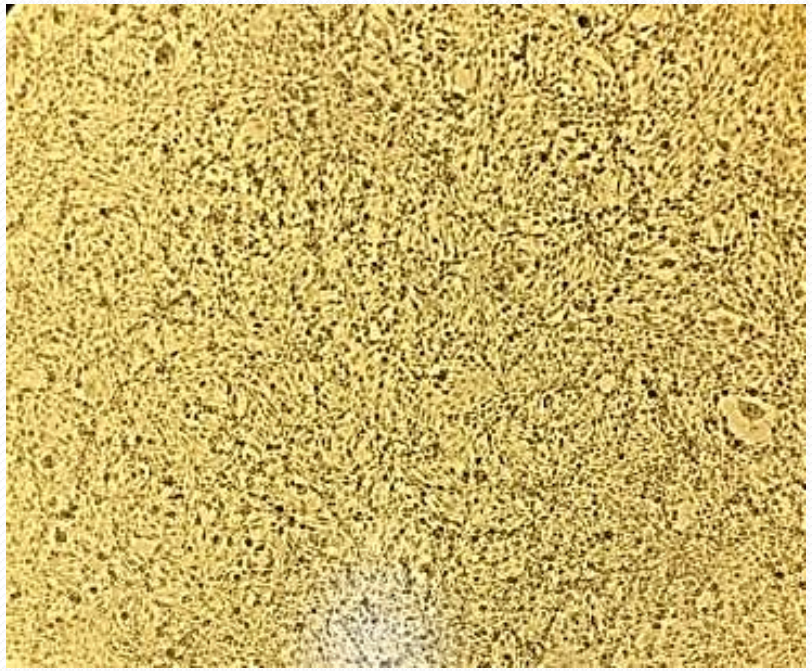
۲- زرد رنگ شدن محیط کشت بدون رشد سلول

۳- مشاهده حرکت ذرات ریز در محیط کشت فلاسک یا پلیت

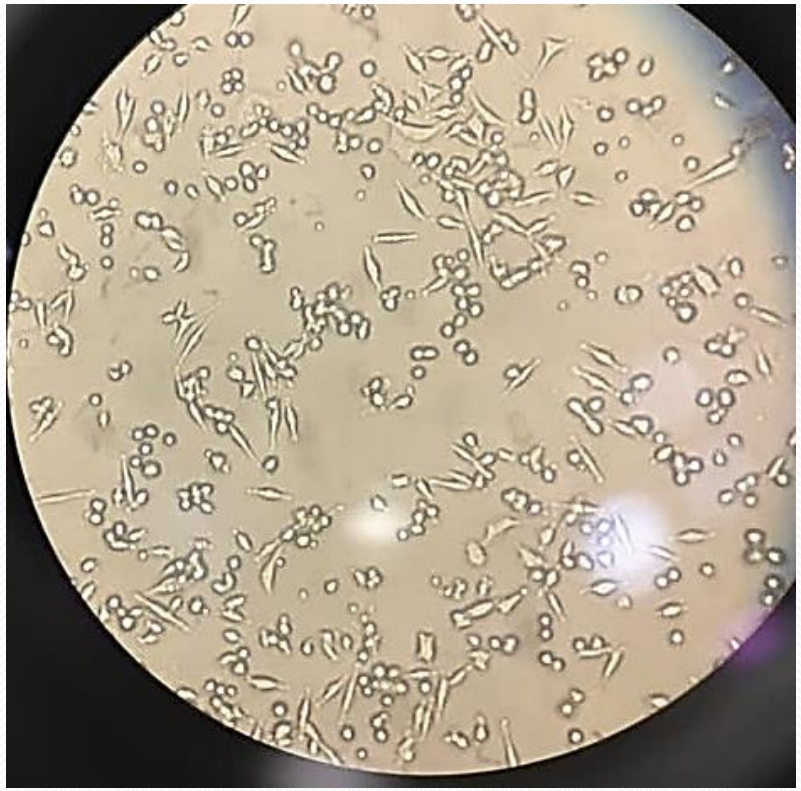
۴- مشاهد سلول ها با مورفولوژی غیر طبیعی، مشاهده دانه های ریز تیره در داخل سلولها و سلول های منهدم شده

سلول های آلوده

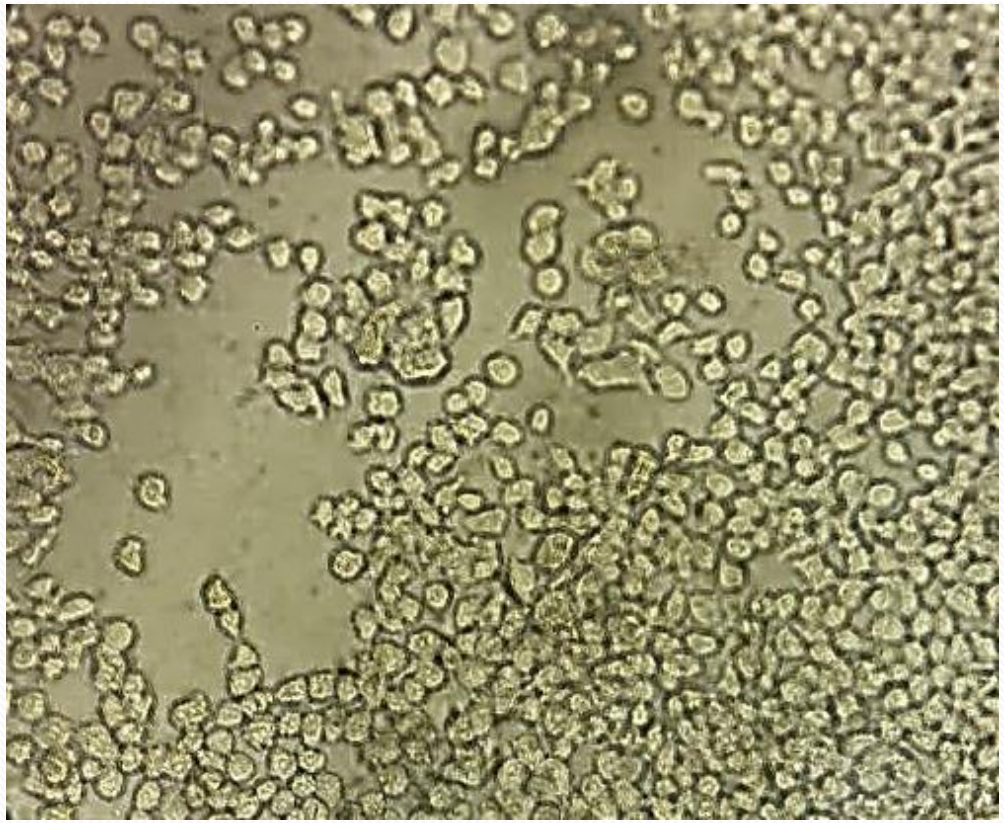


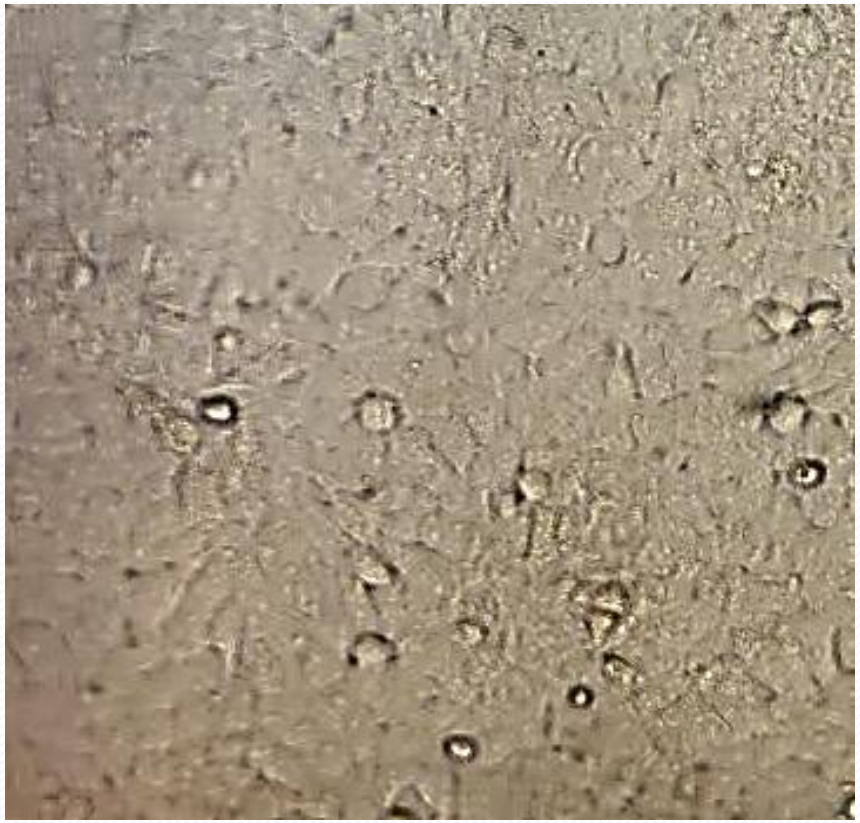


سلول های MCF7

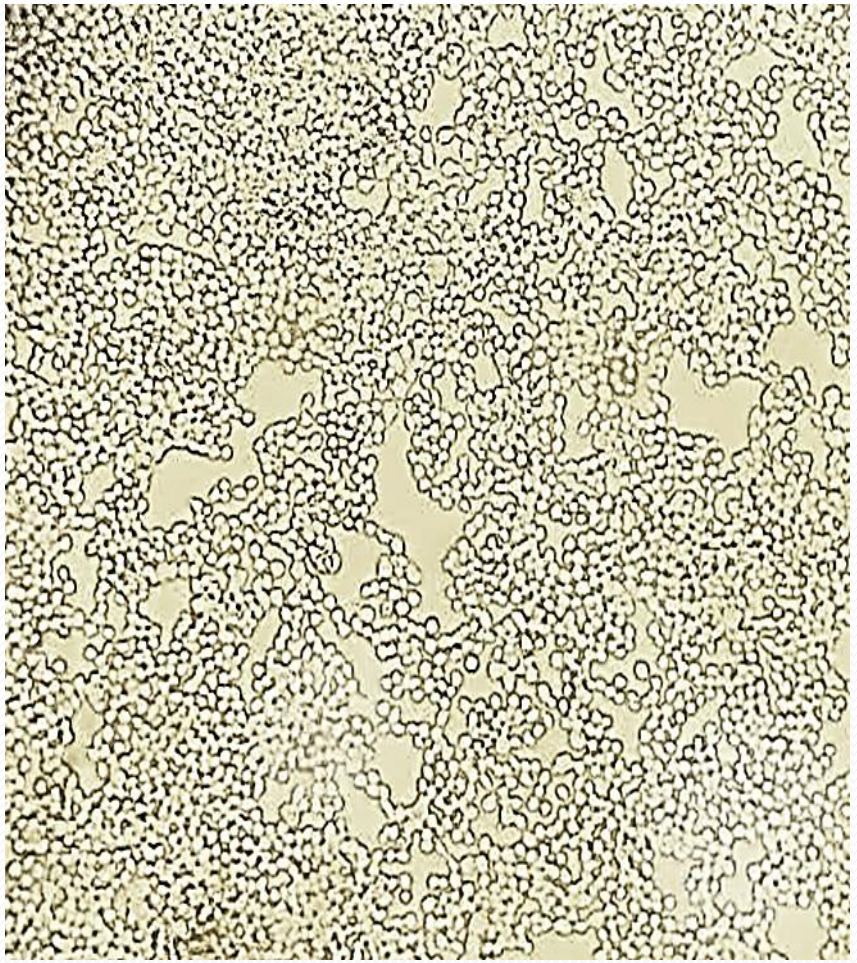


سلول های MCF7

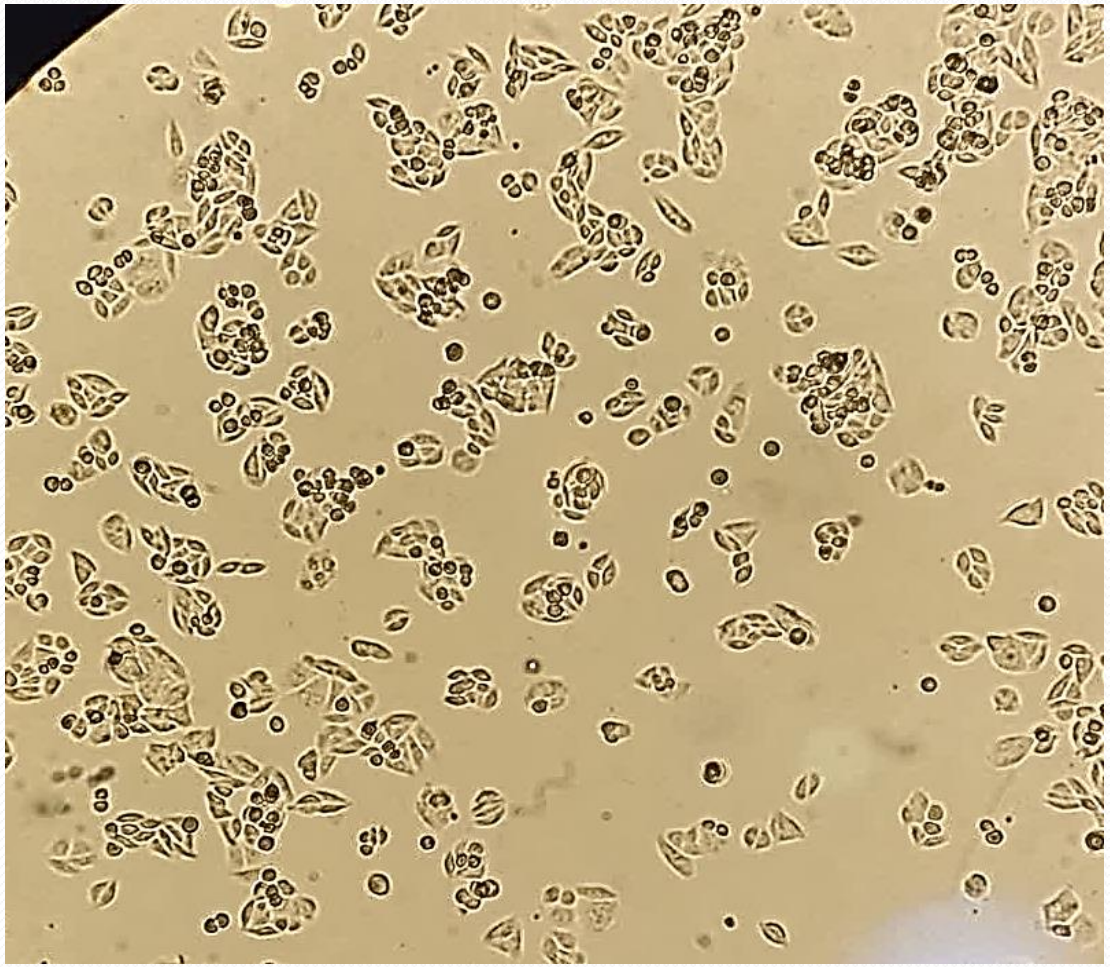


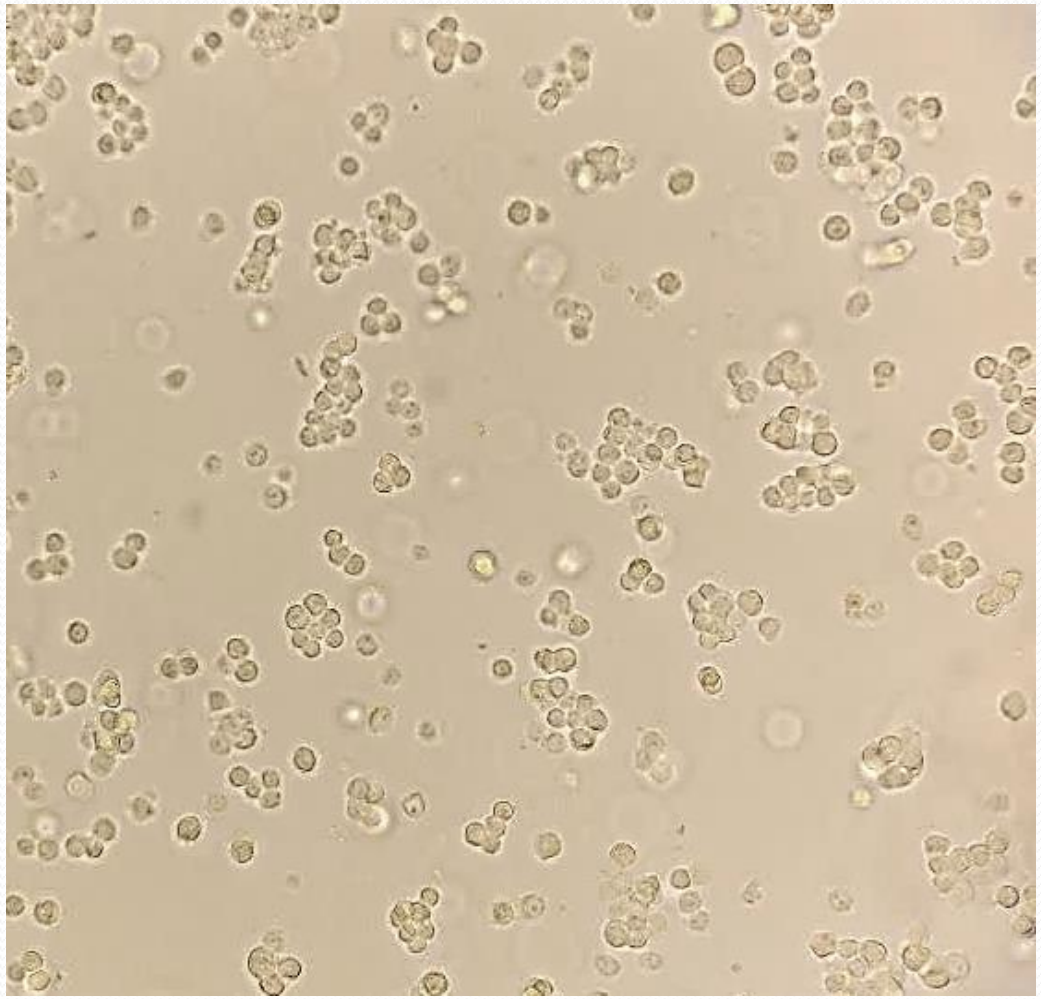


سلول های SW48



سلول های saos2





با تشکر از توجه شما