بسم الله الرحمن الرحیم

دعای مطالعه

اَللهُمَ اَخرِجنی مِن ظُلُماتِ الوَهمِ وَاَکرِمنی بِنُورِ الفَهمِ

اَللهُمَ افتِح عَلَینا اَبوابَ رَحمَتِکَ وَ انشُر عَلَینا خَزائِنَ عُلُومِکَ

بِرَحمَتِکَ یا اَرحَمَ الرّاحِمینَ

پروردگارا، خارج کن مرا از تاریکی‌های فکر و گرامی بدار به نور فهم

پروردگارا، بگشای بر ما درهای رحمتت را و بگستران گنج‌های دانشت را به امید رحمت

تو ای مهربان‌ترین مهربانان

مروری بر روش‌های تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال

ویژه رشته‌های؛

کارشناسی ارشد و دکتری ایمنی‌شناسی

مؤلفین؛

دکتر مهدی یوسفی

بهزاد منصوری– مهسا حاجی‌ولیلی– نویده حق‌نواز

راشده دهقان‌زاده– ندا شجری– فاطمه پورقلی– وحیده علی‌نژاد– شادی اقبال فرد

کتاب جامع ▫ ▫ IQB ▫ میانبر ▫ IQB سالانه ▫

عنوان و نام پدیدآور	: کتاب جامع مروری بر روش‌های تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال ویژه رشته‌های: کارشناسی ارشد، دکتری ایمنی‌شناسی/ مولفین مهدی یوسفی ... [و دیگران].
مشخصات نشر	: تهران: گروه تالیفی دکتر خلیلی، ۱۳۹۵.
مشخصات ظاهری	: [۱۴۴] ص. : مصور، جدول، نمودار.
شابک	: 978-600-422-089-7
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: مولفین دکتر مهدی یوسفی، بهزاد منصوری، مهسا حاجی‌ولیلی، نویده حق‌نواز، راشده دهقان‌زاده، ندا شجری، فاطمه پورقلی، وحیده علی‌نژاد،شادی اقبال‌فرد.
یادداشت	: کتابنامه: ص. [۱۴۴].
موضوع	: پادتن‌ها
موضوع	: Immunoglobulins
موضوع	: پادتن‌های تک‌کلنی
موضوع	: Monoclonal antibodies
موضوع	: ایمنی‌شناسی مولکولی
موضوع	: Molecular immunology
شناسه افزوده	: یوسفی، مهدی، ۱۳۵۹-
رده‌بندی کنگره	: QH۱۸۶/ ۷ ۱۳۹۵ ۴م۲پ
رده‌بندی دیویی	: ۶۱۶/۰۷۹
شماره کتابشناسی ملی	: ۴۲۹۷۵۹۵

نام کتاب: مروری بر روش‌های تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال

مؤلفین: دکتر مهدی یوسفی- بهزاد منصوری- مهسا حاجی‌ولیلی- نویده حق‌نواز- راشده دهقان‌زاده- ندا شجری- فاطمه پورقلی- وحیده علی‌نژاد- شادی اقبال فرد

ناشر: گروه تألیفی دکتر خلیلی

نوبت و سال چاپ: اول- ۱۳۹۵

شمارگان: ۱۰۰۰

چاپ: کیمیای قلم- صحافی: فردوس

مدیر تولید: اقبال شرقی

ناظر فنی چاپ: فرهاد فراهانی

مدیر فنی و هنری: مریم آرده

طراحی و صفحه آرایی: شبنم حضرتی

بهاء: ۱۴۰۰۰ تومان

Website: www.DKG.ir

Telegram.me/drkhaliligroup

آموزشگاه دکتر خلیلی (دفتر مرکزی): ۶۶۵۶۸۶۲۱-۰۲۱

فروشگاه: تهران –خیابان انقلاب–روبه‌روی درب اصلی دانشگاه تهران –پاساژ فروزنده –طبقه همکف –پلاک ۳۳۱

تلفن: ۶۶۴۸۹۳۷۵ – ۰۲۱ – ۶۶۴۸۹۳۴۹ – ۰۲۱

مرکز پخش: ضلع جنوب غربی میدان انقلاب– جنب سینما پارس– مجتمع تجاری پارس – طبقه اول

مرکز فروش: ۶۶۵۶۹۲۱۶ – ۰۲۱

مدیر فروش: ۵۵۰۸۵۸۹ – ۰۹۱۲

طلیعه سخن مؤلف؛

وَ قُلْ رَبِّ أَدْخِلْنِی مُدْخَلَ صِدْقٍ وَأَخْرِجْنِی مُخْرَجَ صِدْقٍ وَاجْعَلْ لِی مِنْ لَدُنْکَ سُلْطَانًا نَصِیرًا (الإسراء/۸۰)

بارالها، مرا با صدق و استواری داخل کن، و با صدق و درستی بیرون آر، و برای مناز جان به خود تسلّطی یاری بخش قرار ده.

حمد و سپاس بی‌کران خویش را به پیشگاه با عظمت خداوند منان تقدیم می‌داریم که توفیق تألیف کتاب مروری بر روش‌های تولید آنتی‌بادی مونوکلونال را برای ما عنایت فرمود. امیدواریم با انتشار این مجموعه قدمی هر چند ناچیز در راه ارتقاء سطح علمی کشورمان برداریم.

با توجه به کمبود منابع فارسی جهت دانشجویان و علاقه‌مندان در زمینه‌ی تولید آنتی‌بادی مونوکلونال، تلاشگر دید اطلاعات و تجارب موجود در قالب مجموعه‌ای منظم تدوین گشته، به‌صورت کتاب حاضر تحت عنوان مروری بر روش‌های تولید آنتی‌بادی مونوکلونال، در دسترس علاقه‌مندان قرار گیرد. در این اثر سعی شده تا اصول مربوط به روش‌های مختلف تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و نحوه انجام این روش‌ها با بیانی ساده و روان توضیح داده شود، به‌طوری‌که بتواند بخشی از نیاز پژوهشگران در این زمینه را بر طرف سازد. استفاده از تجارب و نتایج محققان ایرانی از دگر نکات حائز اهمیت در تدوین این کتاب است. این کتاب برای دانشجویان کارشناسی ارشد و دکتری تخصصی ایمونولوژی تألیف شده است و دانشجویان علاقه‌مند تحصیلات تکمیلی سایر رشته‌ها علوم پایه نیز می‌توانند به آن مراجعه کنند.

وظیفه خود می‌دانم از تمام دوستانی که در تدوین و انتشار این مجموعه کمک نموده اند، مراتب امتنان و تشکر خود را ابراز نمایم. اگر چه سعی بسیار شده تا آن‌جا که ممکن است مجموعه‌ای کم غلط گردآوری شود مع‌هذا خطاها و اشتباهات احتمالاً وجود دارند که امید است خوانندگان عالِم نقایص آن را ضمن تذکر بر ما ببخشایند. وظیفه خود می‌دانم از تمام دوستانی که در تدوین و انتشار این مجموعه کمک نموده‌اند، مراتب امتنان و تشکر خود را ابراز نمایم. اگرچه سعی بسیار شده تا آن‌جا که ممکن است مجموعه‌ای کم غلط گردآوری شود مع‌هذا خطاها و اشتباهات احتمالاً وجود دارند که امید است خوانندگان عالِم نقایص آن را ضمن تذکر بر ما ببخشایند.

دکتر مهدی یوسفی
استادیار ایمونولوژی گروه ایمونولوژی
دانشگاه علوم پزشکی تبریز

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه‌ای بر آنتی‌بادی‌ها ۷

فصل دوم: آنتی‌بادی ۱۲

فصل سوم: تولید آنتی‌بادی مونوکلونال با تکنیک هیبریدومای انسانی ۳۵

فصل چهارم: آنتی‌بادی‌های نوترکیب ۶۰

فصل پنجم: تولید آنتی‌بادی مونوکلونال با روش EBV Transformation ۷۴

فصل ششم: تولید آنتی‌بادی مونوکلونال به روش نمایش فاژی (Phage Display) ۹۰

فصل هفتم: Fc فیوژن پروتئین ۱۱۳

فصل هشتم: مهندسی کربوهیدرات و مهندسی پروتئین ۱۲۷

فصل نهم: تولید آنتی‌بادی مونوکلونال با استفاده از موش‌های ترانس‌ژنیک ۱۳۴

فصل سوم

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال با تکنیک هیبریدومای انسانی

خلاصه

ابتدا موش را ایمیون کرده، سپس خون‌گیری می‌کنیم تا با الایزا تعیین کنیم که موش ایمیون شده یا نه، زمانی‌که موش هایپرایمیون شد (الایزا انجام می‌دهیم و با تزریقات قبلی مقایسه می‌کنیم اگر تیتر آنتی‌بادی با تزریق آنتی‌ژن افزایش پیدا نکرد، حیوان هایپرایمیون شده) و در این هنگام موش آماده فیوژن است. برای این کار طحال موش را در می‌آوریم و سلول‌های طحال را که عمدتاً سلول‌هایB هستند و قدرت بقا ندارند را خارج می‌کنیم. این سلول‌ها، سلول‌های ناپایداری هستند و برای پایدار شدن باید با سلول‌های میلومایی ادغام شوند. (SP2/0: این سلول میلومایی باید Ig^- و $HGPRT^-$ باشد. هم‌چنین باید در آنزیم تیمیدین کیناز و هیپوگزانتین فسفوریبوزیل ترانسفراز نقص داشته باشند تا بتوانیم انتخاب هیبریدوما (Selection) را انجام دهیم. همان‌طور که می‌دانید سلول‌های B، Ig^- هستند). پس از ادغام شدن سلول‌های B با سلول‌های میلومایی سلول‌های هیبرید به‌وجود می‌آیند. سلول هیبرید به‌دست آمده می‌تواند تقریباً به‌طور نامحدود تکثیر شده و آنتی‌بادی تولید کند. به‌دلیل این‌که سلول‌های هیبرید به‌دست آمده از یک منشاء و یک سلول واحد تکثیر شده باشند، آنتی‌بادی تولید شده توسط این هیبرید مونوکلونال نامیده می‌شود. به‌عنوان نتیجه، می‌توان گفت که تکنولوژی هیبریدوما هم‌چنان برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انسانی مفید است که این به‌دلیل پروسه‌ی نسبتاً آسان آن، هزینه‌ی پایین و توانایی نامیراسازی سلول‌های B است که به‌طور مداوم آنتی‌بادی‌های اختصاصی که ساختار اساسی خود را حفظ می‌کنند، را تولید می‌کنند. برای تولید موفقیت‌آمیز هیبریدوماها، کلون‌های اختصاصی آنتی‌ژن گسترش یافته از سلول‌های B انسانی ترانسفورم شده توسط EBV، که با CpG فعال شده‌اند، باید با سلول‌های هتروميلوما، با استفاده از PEG یا الکتروفیوژن بهینه شده، ادغام شوند.

تکنولوژی هیبریدومای استاندارد که توسط Kohler و Milstein ابداع شد، با ادغام سلول‌های تولیدکننده‌ی آنتی‌بادی با سلول‌های میلوما، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید می‌کند. تکنولوژی هیبریدوما دارای چندین خصوصیت مناسب از جمله پروتکل نسبتاً ساده، هزینه‌ی پایین و توانایی نامیراسازی سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال هیبریدوما ساختار اصلی خود را که شامل قطعات ایمونوگلوبولینی متغیر و ثابت است، حفظ می‌کنند. این امر در آزمایشاتی که فعالیت‌های وابسته به FC را اندازه‌گیری می‌کنند، مانند ADCC که به پلی‌مورفیسم قطعه‌ی FC وابسته است، حائز اهمیت

گروه تلیفی دکتر خلیلی

است. به‌علاوه، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال تولید شده توسط هیبریدوما ممکن است مورد استفاده قرار گیرند تا سازگاری‌شان برحسب توالی و عملکرد، با آنتی‌بادی‌های نوترکیب تولید شده توسط تکنیک‌های مولکولی که از همان کلون سلول B برای تولیدشان استفاده شده است، مقایسه شود. ایراد بزرگ روش هیبریدوما، کارایی پایین ادغام است که به تعداد محدود آنتی‌بادی‌های تولید شده در هر آزمایش منجر می‌شود؛ اگرچه، برخی از اصلاحات تکنیکی، کارایی این روش را بالا می‌برند.

تکنولوژی هیبریدومای استاندارد

روش هیبریدومای اصلی به‌منظور تولید مستمر آنتی‌بادی‌های موشی با اختصاصیت مطلوب علیه یک اپی‌توپ خاص مورد استفاده قرار گرفته است. تولید آنتی‌بادی‌ها با استفاده از سلول‌های B طحال گرفته شده از موش‌های ایمن شده و نامیراسازی این سلول‌ها با ادغام آن‌ها با سلول‌های میلومای سرطانی انجام گرفت. تکنولوژی هیبریدومای استاندارد برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انسانی از لنفوسیت‌های B با استفاده از سلول‌های مونونوکلئر خون محیطی (PBMC) افراد آلوده به پاتوژن‌های مختلف یا بیماران سرطانی، مورد استفاده قرار گرفت. این متد دارای چندین جزء است که برای تولید موفقیت آمیز آنتی‌بادی‌های مونوکلونال حائز اهمیت هستند (1,2).

لنفوسیت‌های B انسانی

سلول‌های B اختصاصی آنتی‌ژن به‌ندرت در جریان خون موجودند، که این امر همراه با کارایی پایین ادغام به تولید تعداد معدود آنتی‌بادی مونوکلونال دریک آزمایش خاص منجر می‌شود. بنابر این انتخاب یک دهنده‌ی خونی مناسب برای این متد حائز اهمیت است. تیتر بالای آنتی‌بادی‌های سرم همیشه با تعداد افزایش یافته‌ی سلول‌های B محیطی مربوطه، در ارتباط نیست اما نشان‌دهنده‌ی شانس بالاتر برای تولید موفقیت‌آمیز آنتی‌بادی مونوکلونال است.

لنفوسیت‌های B محیطی انسانی تحریک نشده به‌ندرت استفاده می‌شوند، اگرچه نشان داده شده که آن‌ها می‌توانند با رده‌های سلولی لنفوبلاستوئید یا میلومای انسانی فیوز شده و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را تولید کنند. تحریک سلول‌های B به‌طور اساسی کارایی فیوژن و تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال را بالا می‌برد. به این منظور، روشی که بیش‌تر از همه مورد استفاده قرار می‌گیرد، آلوده کردن و ترانسفورماسیون سلول‌های B با EBV است (1-4).

سلول‌های پارتنر برای فیوژن

چندین رده‌ی سلولی میلومایی وجود دارند که برای فیوژن سلول‌های B انسانی مناسب بوده و در دسترس هستند. از میان این‌ها، رده‌های سلولی SHM-D33 و HMMA 2.5، معمولاً برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مورد استفاده قرار می‌گیرند. این رده‌های سلولی، از ادغام سلول‌های موشی غیرمترشح با هتروميلومای انسانی که به ouabain مقاوم است و در صورت ادغام با سلول‌های B ترانسفورم شده با EBV، هیبریدوماهای پایدار را ایجاد می‌کند، وجود آمده‌اند. هتروميلومای SHM-D33 برای تولید بیش از ۱۰۰ آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی علیه پروتئین‌های پوشش HIV-1 و پارووویروس B19 مورد استفاده قرار گرفته است. رده‌ی سلولی HMMA2.5 با استفاده از الکتروفیوژن با شش رده‌ی سلولی میلومای دیگر مورد مقایسه قرار گرفت و نشان داده شد که دارای بالاترین کارایی ادغام است. این رده‌ی سلولی هم‌چنین برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال علیه HIV-1 استفاده شده است (5,4,1).

گروه تألیفی دکتر خلیلی

سلول‌های مغذی

سلول‌های لنفوئیدی مختلفی که سایتوکاین‌هایی را تولید می‌کنند که رشد و کلونینگ هیبریدها را حمایت می‌کنند، می‌توانند به‌عنوان سلول‌های مغذی (feeder layer) مورد استفاده قرار گیرند. سلول‌های شسته شده‌ی پریتونئال موش که حاوی ماکروفاژها هستند، در گذشته مورد استفاده قرار می‌گرفتند، امروزه این سلول‌ها با مکمل‌های تجاری موجود جایگزین شده‌اند. سلول‌های GK5، سلول‌های میلومای انسانی، برای کلونینگ هیبریدها استفاده می‌شدند که با سلول‌های PBMC اشعه دیده‌ی افراد سالم جایگزین شدند. سلول‌های هیبریدوما هم‌چنین بدون سلول‌های مغذی نیز می‌توانند با کارایی پایین‌تر کلونینگ کلون شوند، اگرچه هیبریدهایی که زنده مانده‌اند، بسیار پایدار بوده و معمولاً تولیدکننده‌های خوب آنتی‌بادی‌های مونوکلونال هستند (1,5).

ادغام (فیوژن)

ادغام عمدتاً با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) یا با الکتروفیوژن انجام می‌گیرد. مکانیسم فیوژن به وسیله PEG به‌طور کامل شناخته نشده است، اما اشاره شده است که PEG ممکن است سرهای لیپیدی را دهیدراته کرده و به عدم تقارن غشای دو لایه بی‌انجامد که به ادغام دو سلول کمک می‌کند. پروسه‌ی انجام آن نسبتاً ساده است؛ PEG به‌صورت قطره قطره به سلول اضافه شده و سپس با چندین بار شستشو، برداشته می‌شود تا از سمیت آن جلوگیری شود. مشکل اصلی در این رابطه، کارایی پایین فیوژن است، که براساس اندازه‌گیری‌های نسبی مثلاً تعداد هیبریدوماها در هر ۵ ۱۰ سلول B، $^{-5}$ ۱۰ است، که این می‌تواند تاحدودی با افزایش تعداد سلول‌های B یا سلول‌های ترانسفورم شده توسط EBV، بهبود یابد.

با استفاده از الکتروفیوژن، غشاهای سلول‌های مجاور با به‌کار بردن یک رشته‌ی الکتریکی پالسی به‌هم متصل می‌شوند. شدت جریان متناوب برای تنظیم سلول‌ها به‌کار می‌رود، و سپس سلول‌ها با پالس‌های مستقیم- متناوب با ولتاژ بالا الکتروپوریت (Electroporate) می‌شوند. در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده، که شرایط الکتروفیوژن را بهینه کرد، کارایی آن به ($^{-۴}$ ۱۰×۴) ۰.۴۳ درصد افزایش یافت و کارایی آن در ایجاد کلنی‌های هیبرید تقریباً ۵ تا ۱۰ بار بیش‌تر از PEG بود. پارامترهای الکتروفیوژن برای سلول‌های خاصی که مورد استفاده قرار می‌گیرند، هم سلول‌های B و هم سلول‌های پارتنر، نیازمند بهینه‌سازی هستند.

فیوژن منجر به شکل‌گیری سه نوع از هیبریدها می شود- سلول B* سلول B، سلول B* سلول پارتنر(میلوما)، سلول پارتنر* سلول پارتنر- و هم‌چنین برخی سلول‌های پارتنر و B ادغام نشده را به‌جای می‌گذارد. مطلوب تکنیک هیبریدوما، هیبرید سلول B* پارتنر است که با استفاده از محیط حاوی هایپوگزانتین- آمینوپترین- تیمیدین (HAT) جداسازی می‌شود، در حالی‌که سلول های B فیوز نشده و سلول‌های هیبرید B* B به‌دلیل طول عمرکوتاه‌شان می‌میرند. اگر سلول‌های B ترانسفورم شده با EBV برای فیوژن استفاده شوند، سپس ouabain به محیط اضافه می‌شود که سلول‌های B ترانسفورم شده‌ی فیوز نشده را می‌کشد. Ouabain یک گلیکوزید قلبی است که پمپ سدیم غشای پلاسمایی را مهار می‌کند و هم‌چنین می‌تواند آپوپتوز انتخابی را در سلول‌های ترانسفورم شده، و نه سلول‌های PBMC، القاء کند.

سلول‌های پارتنر برای فیوژن، فاقد ژن هایپوگزانتین- گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HGPRT) هستند، که آن‌ها را به آمینوپترین، که سنتز نوکلئوتید را توسط مسیر de novo مهار می‌کند، حساس می‌سازد. این سلول‌ها به یک مسیر بازیافت

فرعی روی می‌آورند که با مهیا کردن هایپوگزانتین و تیمیدین، که هر دو در HAT موجودند، پیش می‌رود. از آن‌جا که سلول‌های B به‌دلیل دارا بودن آنزیم HGPRT از مسیر بازیافت استفاده می‌کنند، فقط هیبریدومای سلول B* سلول پارتنر می‌تواند در محیط HAT زنده مانده و به‌صورت کلون‌هایی رشد کرده و آنتی‌بادی مونوکلونال تولید می‌کند. سلول‌های میلومای فیوز نشده نمی‌توانند زنده بمانند، چرا که این سلول‌ها توانایی سنتز نوکلئوتیدها را از مسیرهای de novo یا بازیافت، ندارند.

ادغام بین سلول‌های B ترانسفورم شده با EBV و سلول‌های پارتنر، روش استانداردی برای تولید هیبریدوما گشته است. فیوژن اولیه بین B6، کلون ترانسفورم شده با EBV انسانی که تولیدکننده‌ی آنتی‌بادی علیه توکسوئید کزاز است، و رده‌ی سلول B انسانی KR-4 انجام گرفت. نتایج حاکی از این بود که هیبریدوماهای حاصل، پایدارتر بوده، توانایی کلونینگ بالاتری داشته و آنتی‌بادی‌های بیش‌تری را در مقایسه با سلول‌های B6 ترانسفورم نشده ترشح می‌کنند. توانایی کلونینگ بالای سلول‌های هیبریدوما، که می‌توانند در یک سلول در هر چاهک کلون شوند، خصوصاً حائز اهمیت است؛ از آن‌جا که سلول‌های ترانسفورم شده با EBV، دارای برخی ناپایداری‌های کروموزومی بوده و کلونینگ آن‌ها مشکل است و حتی در حضور سلول‌های مغذی نیازمند حداقل چند سلول در هر چاهک هستند.

غربالگری

سیستم غربالگری به آنتی‌ژنی که مورد استفاده قرار می‌گیرد، وابسته است. اتصال آنتی‌بادی‌ها به آنتی‌ژن‌های محلول، شامل پپتیدها و پروتئین‌ها، معمولاً با روش ELISA،که دارای حساسیت تشخیصی ۰.۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر است، مورد بررسی قرار می‌گیرد. ممکن است از برخی پپتیدهای کوتاه استفاده شود که به شکل بیوتینه شده و غیرمتحرک بر سطح پلیت‌های کوت شده با استرپتاویدین استفاده می‌شوند تا بیش‌ترین میزان تماس با آنتی‌بادی ها را در طول ELISA فراهم کنند. غربالگری با یک روش کاربردی، زمان پروسه‌ی دشوار تولید، برای مثال خنثی‌سازی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انسانی را کاهش می‌دهد. برای اولین بار، از آزمایش خنثی‌سازی سلول TZM-bl برای غربالگری و تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ۲۹۰۹ ، که به‌طور استثنایی دارای فعالیت خنثی‌سازی بالا علیه $HIV\text{-}1_{SF\ 162}$ و خصوصیات فوق‌العاده است، استفاده شده است. این آنتی‌بادی مونوکلونال با روش الایزا به پپتیدها یا پروتئین‌های مونومر متصل نمی‌شود، اما به ویروس سالم متصل می‌شود زیرا یک اپی‌توپ چهار جزیی مرکب را شناسایی می‌کند که حاوی اجزای لوپ‌های V2 و V3، که فقط بر سطح ویروس موجودند، می‌باشد (1, 5-7).

تکنیک کشت سلولی

لوازم مورد نیاز

۱- محیط استریل

از آن‌جایی‌که تمامی کارهای مربوط به کشت سلولی در اتاق کشت سلولی انجام می‌گیرد (به‌جزء کشتن حیوان) لذا لازم است اتاق کشت سلولی عاری از هرگونه آلودگی (اعم از باکتریایی، قارچی و...) باشد. هوای این اتاق باید پیوسته با فیلترهای مخصوص تمیز شود. بهتر است دیوارهای این اتاق با رنگ‌های روغنی رنگ آمیزی شوند تا هم تمیز کردن آن راحت باشد و هم بدین‌وسیله از نفوذ آب جلوگیری شود. پنجره‌های اتاق کشت باید به گونه‌ای باشند که از ورود گردوغبار جلوگیری شود. هم‌چنین کف اتاق و سطوح کار باید حاوی پوشش‌های یکپارچه‌ای باشند تا آب در آن‌ها نفوذ نکند و تمیز کردن آن‌ها راحت‌تر باشد. بهتر است اتاق کشت دور از محیط کاری آزمایشگاه باشد و در این اتاق مشرف به راهرو آزمایشگاه (مکان تردد) نباشد.

گروه تلیسی دکتر خلیلی

۲- انکوباتور

انکوباتور وسیله‌ای است که حرارت ثابتی را ایجاد می‌کند و این حرارت را به‌طور یکنواخت در سراسر محیط پخش می‌کند. همان‌طور که می‌دانید کشت سلولی با رعایت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن و رطوبت انجام می‌گیرد. انکوباتور دمای لازم برای رشد سلول‌ها (بیش‌تر سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کنند) و شرایط ۵ درصد دی اکسید کربن و رطوبت را فراهم می‌کند. در پروسه کشت سلولی برای جلوگیری از خشک شدن سلول‌ها شرط رطوبت باید رعایت شود. برای ایجاد رطوبت در انکوباتور سینی انکوباتور را با آب استریل پر می‌کنیم. همان‌طور که می‌دانید اگر رطوبت بیش از اندازه مطلوب باشد احتمال ایجاد آلودگی (خصوصاً قارچی)، و کم‌تر از حد مطلوب باشد، احتمال خشک شدن دیش کشت سلولی وجود دارد. هیبریدوماها برای ثابت نگه‌داشتن PH محیط، به بی‌کربنات نیاز دارند. بی‌کربنات در این محیط به‌عنوان بافر یونی عمل می‌کند و PH محیط را ثابت نگه می‌دارد جهت این کار گاز کربنیک توسط لوله‌هایی که از سیلندر گاز کمپرس شده منشاء می‌گیرند و به انکوباتور متصل می‌شوند، به انکوباتور منتقل می‌شود و مقدار آن با استفاده از سیستم اتوماتیک ثابت نگه‌داشته می‌شود.

۳- اتوکلاو

اکثر مواد و وسایلی که در اتاق کشت سلولی استفاده می‌شوند از قبیل محلول‌ها، آب، فیلترها، ظروف شیشه‌ای، وسایل جراحی، فیلترها و... را می‌توان با حرارت مرطوب در اتوکلاو استریل کرد. استریل کامل در حرارت ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۰ دقیقه و در فشار Ib/In^2 ۱۰-۱۵ انجام می‌گیرد (بیش‌تر ارگانیسم‌ها نمی‌توانند بیش از ۱ دقیقه این شرایط را تحمل کنند) برای اطمینان از استریل کامل می‌توان از نوار مخصوص اتوکلاو استفاده کرد که این نوارها در درجه حرارت زیاد رنگ‌شان تغییر می‌کند. برای استریل کردن وسایل بزرگ می‌توان از اتیلن اکساید یا اشعه گاما و وسایل کوچک از دیگ زودپز نیز استفاده کرد. برای استریل کردن ظروف شیشه‌ای و وسایل جراحی باید آن‌ها را در ورقه آلومنیومی پیچید و سپس با حرارت خشک (حرارت ۱۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۹۰ دقیقه) استریل کرد. اشیاء کوچک ابتدا با ورقه آلومنیومی پوشیده می‌شوند، سپس اتوکلاو می‌شوند. هم‌چنین دهانه ظروف شیشه‌ای بدون در، ابتدا با پنبه پوشانده شده سپس اتوکلاو می‌شوند. به این ترتیب برای استریل کردن محلول‌ها (به غیر از محیط کشت)، ابتدا باید این محلول‌ها در ظروف شیشه‌ای ریخته شوند و درب آن‌ها مقداری باز گذاشته شود و با ورقه آلومنیومی پوشیده شوند و سپس اتوکلاو گردند.

۴- یخچال و فریزر

محلول‌های محیط کشت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند البته بعضی از معرف‌ها مانند سرم گوساله جنینی (FCS) در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شوند.

برای نگه‌داری سلول‌ها باید از فریزر ۷۰- و ۱۳۵- درجه سانتی‌گراد و یا نیتروژن مایع با دمای ۱۸۶- درجه سانتی‌گراد استفاده کرد.

از آن‌جایی‌که در استفاده از نیتروژن مایع، سلول‌های بالای تانک به‌دلیل کم شدن نیتروژن، بیش‌تر از بقیه در معرض خطر هستند پس باید سلول‌ها را در قسمت‌های وسط و پایین تانک نگه داشت.

۵- سانتریفیوژ

برای جدا کردن و شستن سلول‌ها از سانتریفیوژهایی با قدرت ۱۵۰rpm یا ۴۰۰ g استفاده می‌شود.

در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال می‌توان از سانتریفیوژهایی با قدرت زیاد و مجهز به یخچال هم استفاده کرد.

۶- هود لامینار

همان‌طور که قبلاً اشاره شد، تمامی امور مربوط به کشت سلولی باید در محیط استریل انجام گیرد. برای فراهم کردن محیط استریل، باید از هودهایی که حاوی فیلترهای مخصوص به‌نام فیلترهای HEPA (High – efficiency particle filters) هستند استفاده کرد. هوا با فشار وارد این فیلترها می‌شود و پس از استریل شدن مستقیماً به سطح محیط کار وارد می‌شود. این فیلترها می‌توانند ذرات بزرگ‌تر از ۰.۳ میکرومتر را از هوا خارج کنند. پس بیش‌تر باکتری‌ها و اسپورهای قارچی و... از محیط خارج می‌شوند.

کتاب جامع

حاوی تمامی مطالب و نکات لازم
برای کنکور براساس منابع

تألیف سوالات مشابه کنکور

میانبر

چکیده‌ی تمامی مطالب و نکات لازم
برای کنکور براساس منابع

IQB
Iran Question Bank

جمع‌آوری سوالات کنکور کاردانی به کارشناسی،
کارشناسی ارشد و دکتری به‌صورت فصل‌بندی شده

دریافت نمونه‌ی کتاب به‌صورت رایگان

FREE
DOWNLOAD

www.DKG.ir

گروه آموزشی و تألیفی دکتر خلیلی

کارشناسی ارشد، دکتری

- ✓ مشاوره و برنامه‌ریزی تحصیلی رایگان
- ✓ کلاس‌های آمادگی کنکور کارشناسی ارشد و دکتری
- ✓ برگزاری آزمون‌های آزمایشی در سطح کشور
- ✓ کتاب‌های تست IQB، ماطراحان، تألیفی و ترجمه رفرنس‌ها
- ✓ ارائه کامل‌ترین و به‌روزترین جزوات مکاتبه‌ای

کتاب جامع
حاوی تمامی مطالب و نکات لازم
برای کنکور بر اساس منابع

IQB
جمع آوری سوالات کنکور از ۱۳۶۴ تا ۱۳۹۲
بصورت فصل بندی شده

دریافت نمونه کتاب بصورت رایگان
DOWNLOAD FREE

ماطراحان
تألیف سوالات مشابه کنکور

میانبر
چکیده مطالب در کمترین حجم
همراه بیشترین نکات

دعوت به همکاری

گروه آموزشی و تألیفی دکتر خلیلی از کلیه واحدهای آموزشی و دانشگاهی، اساتید، دانشجویان و همکاران محترم در زمینه تدریس، تحقیق، ترجمه، تألیف کتاب و بسته‌های آموزشی، آماده نمایندگی در سراسر کشور دعوت به همکاری می‌نماید.

شعبه مرکزی: تهران - میدان انقلاب - جنب بانک پارسیان مجتمع تجاری پارس - طبقه دوم
تلفن:۶۶۵۶۸۶۲۱ - ۰۲۱

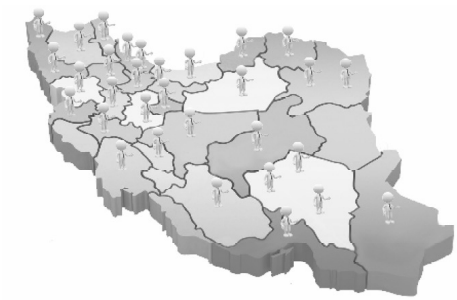
شعبه‌ی میرداماد: تهران، خیابان شریعتی، تقاطع میرداماد، روبه‌روی بیمارستان مفید، کوچه بهشت‌آسا، پلاک ۵ واحد ۱۰تلفن:۲۲۸۵۶۶۲- ۰۲۱

فروشگاه: تهران- خیابان انقلاب- روبه‌روی درب اصلی دانشگاه تهران -پاساژ فروزنده - طبقه همکف پلاک ۳۳۱ تلفن: ۶۶۴۸۹۳۷۵ - ۰۲۱

شماره تماس با نمایندگی‌های فعال و رسمی
گروه تألیفی دکتر خلیلی

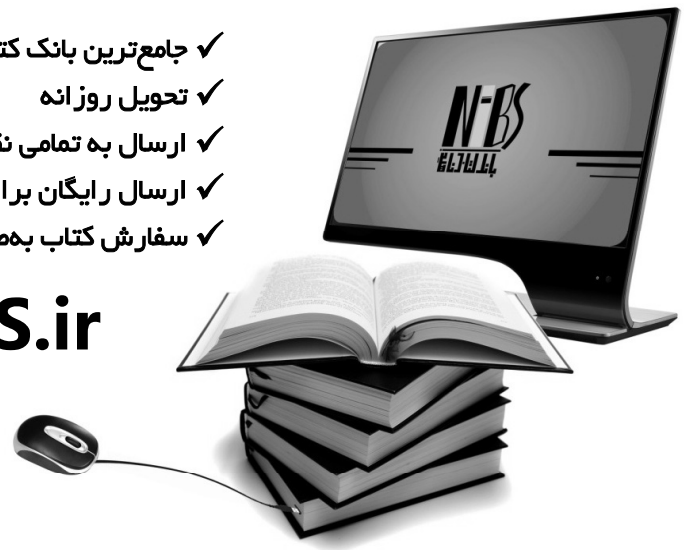
تبریز (خانم عاصمی‌زاده) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۴۷
کرمانشاه (آقای ابراهیمی) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۴۸
قزوین (خانم پورامین) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۴۹
اصفهان (آقای کیانی) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۰
کرمان (آقای رجعتی) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۱
شیراز (آقای فروردین ــ خانم هوشمندی) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۲
رشت (خانم دکتر خدایاری) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۳
اهواز (آقای رضازاده) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۴
همدان (آقای سوری) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۵
مشهد (آقای محرری ــ آقای عتباتی) ۰۹۱۹۵۷۳۰۱۵۶
جیرفت (خانم محمدی) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۰
ارومیه (آقای محمدی) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۱
سنندج (آقای محمدی) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۲
یزد (خانم آزاد) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۳
زاهدان (سراوانی) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۵
گرگان (آقای مختاری) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۷
اردبیل (خانم عاصمی‌زاده) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۸
شهرکرد (خانم تقی‌پور) ۰۹۱۹۹۱۰۱۲۴۹
ساری (آقای دکتر اکبری) ۰۹۱۹۷۷۸۱۹۴۴
قم (خانم امینی) ۰۹۱۹۷۷۸۱۹۴۵
کرج (آقای دکتر علیرضاپور) ۰۹۱۹۷۷۸۱۹۴۷
زنجان (خانم هوشیار) ۰۹۱۹۲۷۰۵۸۷۱
شاهرود (آقای شریعتی) ۰۹۱۹۲۷۰۵۸۷۲
اراک (خانم وکیل) ۰۹۱۹۲۷۰۵۸۷۳
بم (خانم محمدی) ۰۹۱۹۲۷۰۵۸۷۷
خرم آباد (آقای دریکوندی) ۰۹۱۹۲۷۰۵۸۷۸
آبادان (آقای قوام‌پور) ۰۹۱۹۶۲۶۱۲۴۹
سبزوار (آقای اسلامی) ۰۹۱۹۶۳۶۴۶۰۴

بجنورد (آقای دکتر نظری) ۰۹۱۹۶۳۲۱۸۵۲
ایذه (خانم داودی) ۰۹۱۹۶۸۵۳۴۰۵
دزفول (آقای بقامفرد)..... ۰۹۱۹۶۲۸۷۱۶۸
بروجرد (آقای پیرهادی) ۰۹۱۹۶۸۵۳۱۱۶
رفسنجان (خانم استادحسنی) ۰۹۱۹۶۸۲۹۲۸۰
کازرون (آقای صادق‌زاده) ۰۹۱۹۵۳۷۱۹۶۰
شیروان – قوچان (آقای حسین‌زاده) ۰۹۱۹۵۳۷۱۸۹۰
یاسوج (آقای بهنام مقدم) ۰۹۱۹۶۳۵۱۸۵۳
پیشوا «ورامین» (آقای حمید خلیلی) ۰۹۱۹۷۲۸۱۹۶۵
بندرعباس (آقای علی کریمی) ۰۹۱۹۷۲۸۱۹۵۲
سیرجان (خانم صادقی) ۰۹۱۹۵۳۹۶۰۸۲
نیشابور (خانم برزنونی) ۰۹۱۹۶۳۵۰۷۶۸
دامغان (آقای رحمتی) ۰۹۱۹۸۸۲۷۸۸۱
سقز (خانم غفوری) ۰۹۱۹۵۳۲۷۳۷۱
کاشان (آقای صادقی) ۰۹۰۱۳۷۳۷۸۹۸
جهرم (آقای یاعلی‌جهرمی) ۰۹۱۷۷۹۱۱۶۶۲
بیرجند (آقای بهروان) ۰۹۱۹۵۹۰۷۲۰۳
الشتر (خانم ندری) ۰۹۱۹۵۹۰۷۲۰۶
سمنان (آقای رحمتی) ۰۹۱۹۸۸۲۷۸۸۱



بانک کتاب ناهید

«هر کتابی، از هر انتشاراتی را از ما بخواهید»



- ✓ جامع‌ترین بانک کتاب
- ✓ تحویل روزانه
- ✓ ارسال به تمامی نقاط کشور
- ✓ ارسال رایگان برای خرید بیش از ۷۰۰۰۰۰ ریال
- ✓ سفارش کتاب به‌صورت تلفنی و آنلاین

www.NIBS.ir

کتب دانشگاهی، فنی‌و مهندسی، علوم پزشکی، علوم انسانی، عمومی،
ادبی، مذهبی، کمک آموزشی، کودک و نوجوان و کتب نفیس

فروشگاه: تهران – خیابان انقلاب- روبه‌روی درب اصلی دانشگاه تهران
پاساژ فروزنده – طبقه همکف – پلاک ۳۳۱
تلفن: ٦٦٤٨٩٣٧٥ – ۰۲۱ – ٦٦٤٨٩٣٤٩ – ۰۲۱