

# *Cell culture laboratory*

## *Razi Herbal Medicines Research Center*

دستورالعمل کار و  
اصول ایمنی در  
آزمایشگاه کشت سلول

گردآورنده: مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی

## *Cell culture laboratory*

### *Razi Herbal Medicines Research Center*

#### **شرایط لازم برای ورود به آزمایشگاه کشت سلول**

- ✓ داشتن پایان نامه یا طرحی که مرتبط با کشت سلول باشد.
- ✓ گذراندن واحد آموزشی کشت سلول و یا گذراندن آموزشهای لازم و تائیدیه استاد مربوطه.
- ✓ ارائه معرفی نامه از طرف استاد راهنما به مسئول آزمایشگاه کشت سلول.
- ✓ لزوم آشنایی اولیه عمومی با اتاق کشت گروه و تحویل گرفتن کمد.
- ✓ مطالعه قوانین و مقررات ( کتابچه ) آزمایشگاه کشت سلول.

## *Cell culture laboratory*

### *Razi Herbal Medicines Research Center*

## آموزش های لازم برای دانشجویان در بدو ورود به آزمایشگاه کشت سلول

- آشنائی با تجهیزات موجود در آزمایشگاه کشت سلول و آموزش دستورالعمل هر دستگاه
- آشنائی جامع با اصلاحات به کار رفته در کشت سلولی
- آشنایی با انواع محیطهای کشت و مواد و محلول های مرتبط با کشت سلول.
- آشنائی با انتخاب و تهیه محیط پایه و محلول سازی وموارد احتیاط در تهیه محیط های کشت و نگهداری آنها
- آشنائی با روشهای استریل کردن و کنترل آلودگی ونحوه کار کردن در زیر هود
- آشنایی با روشهای جلوگیری از آلودگی سلولی
- آشنائی کامل با کشت سلولهای چسبنده.
- آشنائی با منجمد کردن و آماده سازی برای کشت.

## *Cell culture laboratory*

### *Razi Herbal Medicines Research Center*

#### **استاندارد های کلی کاردر آزمایشگاه کشت سلول**

برای انجام کارهای مربوط به کشت سلول یک آزمایشگاه جداگانه و اختصاصی به صورت استریل در نظر گرفته شده است

- ✓ این اتاق باید عاری از هر گونه شلوغی و تردد غیر ضروری باشد
- ✓ آزمایش هایی که نیاز به فضای استریل ندارد نباید در آزمایشگاه کشت سلول انجام شود
- ✓ شستن دست ها و پوشیدن دستکش و روپوش سفید مخصوص قبل از شروع کار در اتاق کشت سلول الزامی است.
- ✓ روپوش مخصوص آزمایشگاه کشت سلول باید در ورودی آزمایشگاه پوشیده شده و روپوشی که از این محیط خارج می گردد نباید مجددا وارد آزمایشگاه شود.
- ✓ تمام سطوح کار، میزها و قفسه ها و هود باید به طور مرتب با اتانول ۷۰٪ یا یک پاک کننده جایگزین به درستی آلودگی زدایی شود
- ✓ اگر شیوه های استریلیزاسیون به درستی رعایت گردد و نظافت و نظم محیط حفظ شود، می توان تا حدودی از محیط کار استریل آسوده خاطر بود

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

### اصول اولیه کار در آزمایشگاه

- ۱- در اولین ورود خود به آزمایشگاه اطلاعات لازم را از مسئول آزمایشگاه یا اساتید راهنما آموزش ببینید.
- ۲- با روپوش سفید در آزمایشگاه حاضر شوید
- ۳- پوشیدن دستکش در مواقع کاردر اتاق کشت سلول الزامی است
- ۴- هنگام کار با موادی که به پوست شما آسیب می رسانند یا جذب می شوند و هنگام کار با نونه های عفونی از دستکش استفاده کنید
- ۵- افراد کمتر از ۱۶ سال نباید به آزمایشگاه وارد شوند
- ۶- افرادی که دچار ضعف ایمنی بوده و ممکن است در معرض خطر آلودگی با عواملی مثل عفونت قرار گیرند، ورود آنها به آزمایشگاه مجاز نیست
- ۷- نوشیدن، خوردن و جویدن آدامس در آزمایشگاه ممنوع است
- ۸- آزمایشگاه مکانی برای انجام کار جدی و اصولی است. هر ماده شیمیایی باید سمی تلقی شود مگر اینکه کامل معلوم شود سمی نیست. بنابراین در کاربرد موادی که در هر آزمایش با آنها سروکار دارید، باید نهایت دقت را بکار ببرید
- ۹- افراد باید با خطرات ویژه کار آشنا و دستورالعملها و روشهای لازم را مطالعه و بخاطر بسپارند و هر فرد موظف به مطالعه *safety data sheet* موادی که استفاده میکند، می باشد.
- ۱۰- به کلیه موارد اعالم شده در آزمایشگاه توجه کافی داشته و دستور کارها اطلاعیه های نصب شده در آزمایشگاه را رعایت کنید
- ۱۱- آزمایشهای خود را بدون اجازه و هماهنگی قبلی با استاد راهنما انجام ندهید
- ۱۲- در صورت مشاهده هرگونه خرابی یا مشکل در دستگاهها به اساتید راهنما یا مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.
- ۱۳- در صورت عدم استفاده صحیح از دستگاهها و ایجاد خرابی، مسئول خواهید بود
- ۱۴- وسایل آزمایش خود را در موقع آزمایش، منظم روی میز قرار داده، جزوه و دست نوشته هایی را که ممکن است خیس یا آلوده گردند در قسمت بالای میز بگذارید
- ۱۵- از جابجا کردن و تغییر محل دستگاه ها بدون هماهنگی با مسئول آزمایشگاه خودداری کنید

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

۱۶- وسایل و موادی را که مشترکا به کار برده می شوند، بعد از استفاده فوراً به جای خود برگردانید و به هیچ وجه در کمد شخصی خود نگذارید تا سایرین نیز از آنها به موقع استفاده نموده و بی نظمی در آزمایشگاه به وجود نیاید

۱۷- چنانچه ظرف محتوی نمونه خود را در یخچال، فریزر، انکوباتور، بن ماری یا زیرهود قرار می دهید برای جلوگیری از اشتباه نام خود را بر روی برچسب آن یادداشت کنید. در غیر این صورت آزمایشگاه مسئولیتی در قبال بیرون ریخته شدن نمونه شما ندارد.

۱۸- در صورت گم شدن یا دور ریخته شدن وسایل یا نمونه های جا گذاشته شده بر روی میز، هیچگونه مسئولیتی متوجه مسئول آزمایشگاه نمی باشد.

۱۹- هر فرد موظف به رعایت نکات ایمنی حین کار با مواد مورد نظر بوده و صورت ایجاد هر مشکل احتمالی مسئول خواهد بود. لذا در صورت کار با مواد خطرناک، سایر دانشجویان و مسئول آزمایشگاه را نیز آگاه نماید.

۲۰- مراقبت دائم در طی آزمایش از محلول یا موادی که با آن کار می کنید و وظیفه شماست. به این نکته توجه داشته باشید که همکار دیگری در طرفین و یا در مقابل شما مشغول کار و آزمایش است.

۲۱- در هنگام کار با اتیدیوم برماید یا سایر مواد خطرناک، به منظور جلوگیری از آلوده شدن میز زیر دست خود روزنامه یا دستمال کاغذی پهن کنید

۲۲- هر گونه آسیب یا مشکل موجود در هر آزمایش را فوراً به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید

۲۳- اگر به هر دلیلی چشم ها دچار سوزش شد باید بافاصله آنها را مستقیماً زیر شیر آب گرفته و یا از چشم شوی استفاده کنید

۲۴- به وسایل برقی با دست های خیس به هیچ وجه دست نزنید و در صورت بروز هر گونه حادثه با وسایل برقی، اول سیم برق آن را از پریز بکشید

۲۵- چنانچه از گرمکن برقی مثل هیتر استفاده می نمایید، اطمینان حاصل نمایید اینکه سیم های برق آن در اثر بی احتیاطی و چسبیدن به بدنه داغ آن آسیب ندیده و لخت نشده باشند.

۲۶- چندین ظرف را همزمان با یک دست جا به جا نکنید

۲۷- در صورت شکسته شدن هر وسیله شیشه ای ابتدا مسئول آزمایشگاه را

## Cell culture laboratory

### Razi Herbal Medicines Research Center

- مطلع سازید و سپس با دقت خرده شیشه ها را در ظرف مخصوص جمع آوری کنید.
- ۲۸- به محض احساس آلودگی محیط تهویه ها را روشن کرده و در صورت احساس ناراحتی، سریعا آزمایشگاه را ترک و مسئول آزمایشگاه را آگاه سازید
- ۲۹- آزمایش هایی که مواد و بخار و گازهای سمی تولید می کنند، باید در زیر هود آزمایشگاه انجام شود تا آلودگی هوا به حداقل برسد. اسیدهای غلیظ در محفظه هود آزمایشگاه نگهداری شود
- ۳۰- از مواد شیمیائی به اندازه مورد احتیاج برداشته و هیچگاه بدون مشورت با اساتید راهنما مواد شیمیایی دست خورده را به ظرف اصلی بازگردانید.
- ۳۱- هیچگاه اسیدها، قلیاها، مایعات سمی و یا اشتعال پذیر را در دستشویی خالی نکنید
- ۳۲- هر گونه ماد جامد آلوده را در سطل زباله مواد عفونی (زرد رنگ) بریزید و مایعات آلوده را با ساولن و یا هیپوکلریت سدیم خنثی کرده سپس داخل سینک بریزید
- ۳۳- مواد زائد دور ریختنی و کاغذهای باطله و چوب کبریت و اجسام مشابه را در سطلهای مربوطه بریزید و در دستشویی نریزید .
- ۳۴- هرگز ماده اشتعال پذیر را در معرض شعله قرار ندهید. هنگام کار با مایعات اشتعال پذیر، از هود دودکش دار استفاده کنید.
- ۳۵- بخاطر داشته باشید که بخارهای مایعات اشتعالپذیر همواره سنگینتر از هوا هستند، از این روی، در راستای میزها و درون فاضالب حرکت می کنند و درون دستشویی ها باقی می مانند. به همین دلیل همه شعله های موجود در جوار یک مایع اشتعال پذیر را باید خاموش نمود.
- ۳۶- هر گونه استفاده از حلال های آلی چنانچه شعله ای در آزمایشگاه روشن باشد هر چقدر هم که منبع حرارتی در فاصله دور باشد، خطرناک و بازی با جان خود است
- ۳۷- روش صحیح مخلوط کردن محلول های غلیظ اسیدی با آب را بیاموزید همیشه بایستی اسید غلیظ را به آرامی به آب بیافزاییم و هرگز آب را به حجم زیادی از یک اسید اضافه نکنید. در میان اسیدها، اسید سولفوریک خطرناکترین است.
- ۳۸- توجه داشته باشید تحت هیچ شرایطی، مواد یاد شده را با دهان بوسیله پیت بیرون نکشید. هرگز پیت را وارد ظرف اصلی حاوی اسید غلیظ یا هر ماده دیگری نکنید

## Cell culture laboratory

### Razi Herbal Medicines Research Center

۳۹- رعایت نظافت در تمامی لحظات حضور در آزمایشگاه مسئله مهمی است میز کار خود را همواره تمیز نگه دارید

۴۰- وسایل شیشه ای شکسته شده و مواد جامد و مایع زائد و زباله را در جایی که برای آنها تعبیه شده است قرار دهید و هیچ گاه آنها را در درون دستشویی نریزید

۴۱- کار با مواد فرار در آزمایشگاه عینک بزنید. هر گاه دارویی به چشم شما پرید، زود چشمتان را با آب بشوئید و سریع مسئول آزمایشگاه را آگاه سازید

۴۲- هرگز از لنز چشمی در آزمایشگاه استفاده نکنید. حتی اگر عینک ایمنی هم به چشم داشته باشید، این لنزها بخارها را جذب می کند و بیرون آوردن آنها در موارد ضروری مشکل است.

۴۳- از تماس مستقیم پوست، از تنفس بخار مواد شیمیائی علی الخصوص بوکردن مستقیم مواد و بخارات آنها و همچنین از چشیدن مواد خودداری کنید.

۴۴- عنوان روی ظرف هر ماده را قبل از مصرف محتویات آن کنترل نمائید سهل انگاری در این مورد گاهی فاجعه بار است

۴۵- از دست زدن به مواد شیمیائی یا وسایل ودستگاههایی که خطرات یا طرز کار آنها را نمی دانید، جدا خودداری کرده و از اساتید راهنما، راهنمائی و کمک بخواهید

۴۶- اگر اسید یا مواد خورنده دیگری بر روی میز یا زمین ریخت، فوراً پس از اطلاع به مسئول آزمایشگاه و هماهنگی با وی محل را با آب فراوان شستشو دهید

۴۷- هیچگاه ماده ای را مستقیماً با دست بر ندارید و از وسایلی نظیر اسپاچول استفاده کنید  
۴۸- در شکستن و خرد کردن مواد جامد برای وزن کزدن، تمرین و دقت کافی بعمل آورید. ممکن است پاشیدن و پرتاب شدن ذرات جامد به صورت شما یا اطراف موجب خطر گردد.

۴۹- از گذاشتن وسایل شخصی خود (کیف، موبایل، جزوه و ...) در آزمایشگاه خودداری کنید. در صورت گم شدن هیچ گونه مسئولیتی متوجه مسئول آزمایشگاه نخواهد بود

۵۰- محل های کپسول آتش نشانی، جعبه کمک های اولیه و چگونگی استفاده از وسایل ایمنی موجود را بدانید

۵۱- در ساعات غیر اداری مسئول هر گونه حوادث احتمالی و یا گم شدن وسایل میباشید. لذا موظفید در زمانهایی که به هردلیلی در آزمایشگاه حضور ندارید درب آزمایشگاه را قفل نموده و وسایلی مثل هود



# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

،ترازو،سانتریفوژ ومیکروسکوپ و غیره را خاموش کنید  
۵۲-در پایان آزمایش نیز تمامی وسایلی را که استفاده نموده اید با مایع شوینده شسته و در سبد کنار  
ظرفشویی یا کمد خود قرار داده و میز کار خود را تمیز کنید  
۵۳-پس از اتمام کار صندلی ها به جای اول خود برگردانید  
۵۴-پیش از ترک آزمایشگاه.کنترل کلیه دستگاهها ،خاموش کردن دستگاههای روشن کشیدن روکش  
دستگاههایی که با آن کار کرده اید ،شستشوی دست ها به صورت تمیز و مطمئن و قفل نمودن درب  
آزمایشگاه کارهایی است که باید از انجام آن مطمئن شوید.

### تجهیزات موجود در آزمایشگاه کشت سلول :

#### ۱- هود

کاربرد دستگاه: این دستگاه به کمک فیلتر های هپا ذرات و میکروارگانیسم های موجود در فضا را گرفته  
و یک فضای استریل برای کار با سلول ایجاد می کند.  
دستورالعمل کار با دستگاه: پس از روشن کردن هود فن آن را روشن کنید و پس از حدود ۱۰ دقیقه از  
آن استفاده کنید  
احتیاطات لازم هنگام کار با دستگاه:

- ✓ دستگاهها و مواد موجود در داخل هود باید در حد حداقل ممکن باشند.نباید جریان گردش هوا  
به فضای اشغال شده پشتی ،مسدود شود.
- ✓ چراغهای شعلهای نباید در هود استفاده شوند .گرمای تولید شده در جریان طبیعی هوا اختلال  
ایجاد میکند و ممکن است به فیلترها آسیب برساند.
- ✓ کلیه کارها باید در بخش میانی یا عقبی میز کار انجام گیرد و از طریق پانل شیشههای قابل رویت  
باشد.
- ✓ پشت سرکاربر ،نبایستی شلوغ باشد.
- ✓ کاربر نبایستی با جابجایی مکرر دستهایش باعث آشفتهگی جریان هوا شود.
- ✓ سطح هود بایستی با بهکارگیری یک ماده ضد عفونی کننده مناسب بعد از اتمام کار و پایان روز  
خشک و تمیز شود.

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

فن هود بایستی حداقل به مدت ۵ دقیقه قبل از شروع کار و بعد از اتمام کار در کابینت جریان داشته باشد

### ۲- انکوباتور $CO_2$ دار

کاربرد دستگاه: این دستگاه شرایط بهینه لازم برای رشد سلول ها نظیر دما، رطوبت و سطح مناسبی از دی اکسید کربن را فراهم می آورد.

در تکنیک های کشت سلولی پستانداران و حیوانات خونگرم شرایط زیر مطلوب است:

$T:37c$  humidity: 70-80%  $CO_2:5\%$

اغلب محیط کشت های موجود دارای بی کربنات سدیم هستند که به کمک دی اکسید کربن موجود در انکوباتور سیستم بافری مناسبی برای تنظیم  $PH$  فراهم می آورند. ارغوانی شدن محیط کشت بودن سلول نشانه کم بودن دی اکسید کربن و و زرد شدن آن نشانه زیاد بودن دی اکسید کربن است. رطوبت انکوباتور از آب مقطر استریلی که در سینی استیل مخصوص داخل آن ریخته شده است فراهم می گردد دستورالعمل کار با دستگاه: تنظیمات لازم از قبل به دستگاه داده شده است. دستگاه آماده برای گذاشتن ظروف حاوی سلول می باشد

احتیاطات لازم هنگام کار با دستگاه:

- ✓ بعد از وصل کردن سیلندر گاز، فشار گاز در مانومتر اولیه کنترل گردد
- ✓ در هر بار استفاده از دستگاه از بسته بودن درب آن اطمینان حاصل کنید.
- ✓ هنگامیکه درجه حرارت انکوباتور بر روی ۳۷ تنظیم می باشد درجه حرارت محیطی نباید از ۳۲ درجه بیشتر باشد.
- ✓ رطوبت موجود فضا را برای رشد باکتری ها و قارچ ها فراهم می آورد. لذا ظرف آب بایستی به صورت هفتگی با فور ۱۸۰ درجه واتانول ۷۰ درصد استریل و آب تازه به آن ریخته شود
- ✓ ظروف کشت سلول را با فاصله از یکدیگر قرار دهید تا جریان هوا به خوبی صورت گیرد. اگر فاصله این ظروف کم باشد تعدیل دما و گاز در بین آنها به خوبی صورت نمی گیرد
- ✓ همیشه مراقب باشید که درب داخلی انکوباتور خوب بسته شده است
- ✓ قبل از برداشتن فالسک های کشت سلول، از دستکش های التکس استفاده نموده و حتما دست ها را ضد عفونی نمائید

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

- ✓ در انکوباتورهای کشت سلولی میزان  $CO_2$  تحت تاثیر میزان رطوبت بوده و پائین آمدن رطوبت باعث بالا رفتن میزان گازدر سنسور دستگاه می شود تمیز نمودن مرتب این سنسور با الکل ۷۰ درصد یا ایزوپروپیل الکل ضروری است
- ✓ هنگام استفاده از الکل جهت تمیز نمودن داخل انکوباتور دقت لازم را بعمل بیاورید بویژه اگر انکوباتور با الکل در درجه حرارت های بال تمیز شود در این شرایط الکل بخار شده تمام فضای داخل انکوباتور را فرا گرفته و ممکن است خطر انفجار روی دهد بنابراین تمام الکل باقی مانده را به خوبی پاک کنید
- ✓ برای جلوگیری از آلودگی در انکوباتور، قفسه ها و دیواره دستگاه همواره باید خشک باشد
- ✓ در اثر باز ماندن درب دستگاه به مدت طولانی رطوبت موجود در انکوباتور بصورت قطرات آب در آمده و این قطرات روی قفسه و دیواره ها باعث رشد باکتریها، قارچها و مخمرها می شود و در این موارد آب موجود را کامل خشک کنید و محل را به خوبی ضد عفونی نمایید

### ۳- تانک ازت مایع

کاربرد دستگاه: ازت مایع با دمایی نزدیک به  $-196^{\circ}C$  درجه زیر صفر محیط مناسبی برای نگهداری طولانی مدت سلول ها و اصطلاحاً فریز آنها می باشد. این عمل به منظور ممانعت از جهش سلولی و محافظت از لاین سلولی در مقابل آلودگی و دیگر اتفاقات ناگوار صورت می پذیرد

دستورالعمل کار با دستگاه: جهت قرار دادن ویال سلول و یا خارج کردن آن از تانک ازت با حتماً با مسئول آزمایشگاه هماهنگ کنید.

احتیاطات لازم هنگام کار با دستگاه:

- ✓ کلیه ویال های سلول که در تانک ازت گذاشته می شوند باید دارای برچسب مشخصات کامل سلول و تاریخ فریز باشند.
- ✓ به علت تبخیر سریع ازت مایع، درب تانک نباید بازماند
- ✓ چک کردن سطح ازت در تانک ضروری است.
- ✓ ازت مایع، بی رنگ، بی بو، بی مزه ولی کشنده است
- ✓ ازت مایع بی نهایت سرد و به سرعت میزان اکسیژن محیط وبافت را کاهش می دهد و برای بافت چشم بخصوص بسیار خطرناک است
- ✓ هنگام کار با تانک ازت پوشیدن دستکش ضخیم و استفاده از ماسک و عینک محافظ ضروری می باشد.

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

- ✓ اگر شخصی بوسیله ازت مایع دچار سرگیجه شده ویا کمی بی هوش گردید ،اورا به محیط کامل باز برده و گرم نگه دارید
- ✓ اگر ازت مایع روی دست ،پا ویا صورت بریزد باید محل آسیب دیده بالفاصله با آب ۴۰-۳۵درجه گرم شود.

### ۴- PH متر دیجیتال

کاربرد دستگاه: PH متر دستگاه الکترونیکی برای محاسبه PH مواد است. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر (probe) و اندازه گیر (meter) است. میله کاوشگر PH محلول را تبدیل به سیگنال الکتریکی کرده و اندازه گیر آن را تحلیل و میزان PH را نمایش می دهد. دستورالعمل کار با دستگاه:

- دستگاه را به برق (منحصرا پریزهای متصل به UPS) متصل کنید
- الکتروود دستگاه را از محل مخصوص آن خارج کرده و با پیست آب مقطر آن را شستشو داده و با دستمال کاغذی به آرامی خشک کنید.
- دکمه ON/OFF را فشار دهید.
- الکتروود را وارد محلول مورد نظر نمائید (کافی است حلقه سیاه رنگ وارد محلول شود)
- دکمه  $PH/mv/c^{\circ}$  را فشار دهید تا PH محلول نشان داده شود
- در پایان کار دکمه ON/OFF را فشار دهید
- الکتروود را از محلول خارج کنید و با آب مقطر شستشو داده و با دستمال خشک کنید و در محل مخصوص خود قرار دهید.
- احتیاطات الزم هنگام کار با دستگاه:

- ✓ از این PH متر صرفا برای سنجش PH با فرهای رایج در آزمایشگاه کشت سلول و یا محیط های کشت سلول استفاده می شود
- ✓ به هیچ عنوان برای سنجش PH محلولهای دیگر از آن استفاده نکنید
- ✓ در صورت هر گونه سوال از کارشناس آزمایشگاه کمک بخواهید.

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

### ۵- میکرو پلیت ریدر

کاربرد دستگاه: دستگاه میکروپلیت ریدر (*Microplate – Reader*) معمولاً به نام های میکروفوتومتریک – پلیت ریدر، دستگاه الیزا ریدر و خوانش گر الیزا نیز نامیده می شود. یک اسپکتروفوتومتر تخصصی بوده که به منظور قرائت نتایج فتومتریک آزمایش ها طراحی شده است. دستورالعمل کار با دستگاه:

- دستگاه را به برق (منحصراً پریزهای متصل به *UPS*) متصل کنید
  - دکمه *ON/OFF* را در پشت دستگاه روشن کنید
  - کمی صبر کنید تا منوی اصلی دستگاه نمایان شود پس پلیت ۹۶ خانه خود را پس از برداشتن درب در قسمت مخصوص فیکس کنید با قلم مخصوص دستگاه گزینه *test* را از منوی اصلی انتخاب کنید
  - پنجره *Select plate parameter* را *OK* کنید
  - از گزینه *New* برنامه مورد نظر خود را انتخاب کنید
  - خانه های حاوی نمونه را روی نقشه پلیت ۹۶ انتخاب کنید
  - گزینه *Start* را فشار دهید
  - در صورت نیاز به چاپ داده ها گزینه *Print* را فشار دهید
  - پس از پایان کار از گزینه *Exit* و بعد *Cancel* از برنامه خارج شوید
  - پلیت خود را از دستگاه خارج کنید
- احتیاطات الزم هنگام کار با دستگاه:

- ✓ هرگز قبل از آمدن *Menu* اصلی پلیت را داخل دستگاه قرار ندهید.
- ✓ هرگز پلیت را با درب داخل دستگاه قرار ندهید زیرا باعث آسیب جدی به دستگاه می شود
- ✓ حتماً قبل از شروع کار نحوه قرار دادن پلیت را در محل مخصوص از کارشناس آزمایشگاه آموزش ببینید.
- ✓ برنامه ها توسط کارشناس برای دستگاه تعریف شده است، در صورت نیاز به برنامه جدید حتماً از کارشناس کمک بخواهید و از ایجاد تغییرات در برنامه ها خودداری کنید.

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

### ۶- سانتریفیوژ یخچال دار

کاربرد دستگاه: ایجاد نیروی گریز از مرکز و جداسازی مواد در یک محلول حساس به حرارت دستورالعمل کار با دستگاه: دکمه *ON/OFF* کنار دستگاه را فشار دهید تا دستگاه روشن شود. در کنار پنجره *Menu* دستگاه دو دکمه در سمت راست یک دکمه در سمت چپ دیده می شود. دکمه سبز رنگ سمت چپ، دکمه *Start* و دکمه نارنجی *Start* برای بازکردن درب دستگاه به کار می رود. دکمه *Stop* که فعال به حالت خاموش است و بعد از *Start* زدن به رنگ قرمز در می آید برای *Stop* کردن دستگاه می باشد. پس از بازکردن درب دستگاه، به کمک آچار مخصوص و با راهنمایی کارشناس آزمایشگاه روتور مورد نظر خود را روی دستگاه نصب کنید. حال درب دستگاه را دوباره بسته و تنظیمات مورد نظر را انجام دهید. با چرخاندن پیچ آبی سمت چپ می توانید کلمه *Set* را روی قسمت های مختلف *Menu* جابجا کنید. ابتدا *Set* را در کنار قسمت *Timer* قرار دهید. حال با یک بار چرخاندن پیچ آبی سمت راست *Set*، شروع به چشمک زدن می کند و آماده اعمال تغییر می شود. با چرخاندن های بعدی پیچ سمت راست *Time*، مناسب را انتخاب کنید.

\* نکته: در قسمت *Second* با هر بار پیچاندن پیچ آبی ۱۰ ثانیه افزایش زمان خواهید داشت برای تغییر زمانی در حد ۱ ثانیه، با یک دست دکمه *Start* را فشار دهید و با دست دیگر پیچ آبی سمت راست را بچرخانید تا ثانیه دلخواه را به دست آورید

با یک بار فشار دادن پیچ سمت راست، تغییر ایجاد شده را ثابت کنید.

- با چرخاندن دوباره پیچ آبی سمت چپ *Set* را جا بجا کرده تا در قسمت *speed* یا دور قرار گیرد. بر حسب پروتکل، واحد *g* یا *rpm* را انتخاب کرده و مانند قسمت *Time* تغییرات عددی الزم را انجام دهید.
- نکته: هرگز دور را تا میزان *Max* بالا نبرید زیرا باعث آسیب جدی به موتور دستگاه خواهد شد
- اگر پروتکل شما نیاز به دمای خاصی دارد با بردن *Set* در کنار قسمت *Temperature* دمای لازم را انتخاب کنید.
- نکته: در صورت انتخاب دمای پایین (حدود ۴ درجه) یخچال دستگاه به کار می افتد. حتما پس از پایان کار دما را دوباره به حالت دمای اتاق برگردانید.

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

- نکته: بین ۱۵ تا ۳۰ دقیقه زمان لازم است تا دستگاه به دمای مورد نظر برسد در طول آن زمان حتما درب دستگاه را به حالت بسته قرار دهید.
- هر روتور شماره مخصوص خود را دارد که روی آن حک شده است، قبل از *Start* زدن شماره روتور را با شماره *Rotor* که در پایین صفحه *Menu* دستگاه ظاهر شده است چک کنید در صورت مغایرت درب دستگاه را بسته و در حد چند ثانیه دستگاه را *Start* کنید تا دستگاه روتوری که شما نصب کرده اید شناسایی کند
- قبل از اینکه دستگاه را *Start* کنید، با فشار دادن دکمه *Stop* می توانید حالت *Soft start* و یا *Soft start* را به صورت جداگانه یا هم زمان انتخاب کنید.
- پس از ایجاد تنظیمات الزم پیچ آبی چپ را چرخانده تا روی حالت قفل قرار بگیرد
- حالا می توانید درب دستگاه را باز کرده نمونه های خود را با رعایت بالانس لازم درون دستگاه قرار دهید و پس از بستن درب دستگاه آن را *Start* کنید.
- پس از گذشتن زمان داده شده، دستگاه بوق مخصوصی زده و شما می توانید درب دستگاه را باز کرده و نمونه های خود را به آرامی خارج کنید.
- در پایان کار دکمه *ON/OFF* کنار دستگاه را فشار داده و دستگاه را از برق خارج کنید احتیاطات الزم هنگام کار با دستگاه:
- ✓ هرگز دور را تا میزان *Max* بال نبرید زیرا باعث آسیب جدی به موتور دستگاه می شود
- ✓ در صورت انتخاب دمای پایین (حدود ۴ درجه) یخچال دستگاه به کار می افتد.
- ✓ حتما پس از پایان کار دما را دوباره به حالت دمای اتاق برگردانید.

### ۷- کپسول گاز فشرده: $CO_2$

- کاربرد دستگاه: تامین  $CO_2$  برای انکوباتور
- دستورالعمل کار با دستگاه: نصب کپسول توسط تکنسین تاسیسات صورت گیرد.
- احتیاطات الزم هنگام کار با دستگاه:
- ✓ برای جلوگیری از آسیب های مربوط به گازهای فشرده شامل خفگی انفجار سوزی توجه به نکات زیر ضروری است:

## *Cell culture laboratory*

### *Razi Herbal Medicines Research Center*

- ✓ در حالی که کپسول را به کمک تسمه یا زنجیر بسته اید در موقعیت عمودی جابجا کنید
- ✓ در هنگام جابجایی سرپوش محافظ را در بالای کپسول قرار دهید
- ✓ از چرخ‌های مخصوص برای جابجایی سیلندر استفاده کنید و با تسمه یا زنجیر سیلندر را به چرخ ببندید.
- ✓ هنگامی که از سیلندر استفاده نمی‌کنید شیر بالای آن را بسته نگاه دارید
- ✓ سیلندر را در مسیر راه و نزدیک در قرار ندهید
- ✓ سیلندر را از نور خورشید و منابع گرمایی و رطوبت دور نگاه دارید
- ✓ از وارد شدن ضربه به سیلندر جلوگیری کنید
- ✓ برای هر گاز از رگوالتور ویژه همان گاز استفاده کنید
- ✓ برای امتحان نشت احتمالی اتصال‌ها از آب صابون یا محلول‌های مناسب دیگر استفاده کنید



# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

### سیستم های خنک کننده

محیط کشت و بافرها	4°C	یخچال
سرم ها ، آنزیم ها و اسیدهای آمینه غیر ضروری ، گلوتامین ، پیرووات ، آنتی بیوتیک ها	-20°C	فریزر
انجماد اولیه سلول ها	-70°C	فریزر
نگهداری سلول ها برای مدت زمان طولانی	-196°C	تانک ازت

### روش های استریلاسیون در آزمایشگاه کشت سلول :

استفاده از حرارت مرطوب (اتوکالو): استفاده از بخار اشباع شده تحت فشار (اتوکالو کردن) مفیدترین و قابل اعتمادترین روش استریلیزاسیون وسایل آزمایشگاهی است. از امتیازات اتوکالو سرعت عمل، قابلیت نفوذ زیاد و درجه رطوبت بالا می باشد که تمامی این ها موجب انعقاد پروتئین در میکروب ها می شود.

استفاده از حرارت خشک (فور): از آن به منظور استریل یا خشک کردن وسایل شیشه‌های و یا فلزی که در آزمایشگاه به کار میرود ، استفاده میشود. استریل و خشک کردن وسایل فلزی تمیز شده با کمک حرارت و در دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت صورت میگیرد. با افزایش تدریجی دمای آن ، رطوبت موجود در وسایل شیشه‌های تبخیر شده و بنابراین موجب از بین رفتن هر گونه فعالیت بیولوژیکی خواهد شد.

استفاده از کلرین (هیپوکلریت سدیم): کلرین ، یک اکسیدان سریع‌الثر ، یک میکروبیکش شیمیایی موثر بر روی انواع میکرو ارگانیسم ها و به سهولت قابل دسترس است. این ماده به‌طور معمول به صورت سفیدکننده (وایتکس) فروخته میشود ، و در واقع محلول مایع هیپوکلرایت سدیم ( $NaOCl$ ) است و میتوان برای دستیابی به غلظت مد نظر آنرا با آب رقیق کرد.

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

- ✓ محلول های هیپوکلریت موجود در بازار حاوی  $50000$  PPM کلر می باشند
- ✓ غلظت های مورد استفاده از این ماده برای مصارف مختلف به شرح زیر میباشد
  - ظروف آزمایشگاه ۱ به ۲۰ ( $2500$  PPM)
  - محیط آزمایشگاه ۱ به ۵۰ ( $1000$  PPM)
  - وسایل تمیز ۱ به ۱۰۰ ( $500$  PPM)
- ✓ به علت ناپایدار بودن محلول هیپوکلریت سدیم باید به صورت روزانه تهیه شود. یک محلول مناسب باید زرد رنگ باشد و بوی کلر به وضوح از آن استشمام شود.

### موارد احتیاط استفاده از هیپوکلریت سدیم:

- ✓ کلرین بخصوص به صورت سفید کننده دارای خاصیت قلیایی بالایی است که میتواند سبب خوردگی فلزات شود. فعالیت آنها بهطور قابل ملاحظه ای به وسیله مواد ارگانیک (پروتئین) کاهش مییابد.
- ✓ نگهداری محلولهای استوک سفیدکننده در ظروف باز بویژه در دماهای بالا باعث آزاد شدن گاز کلرین و در نتیجه کاهش قدرت خاصیت میکروبیکی آنها شود.
- ✓ گاز کلرین بسیار سمی است، بنابراین باید سفیدکننده فقط در محلی نگهداری شود که دارای تهویه مناسب باشد. همچنین نبایستی سفید کننده را با اسید مخلوط کرد زیرا به سرعت گاز کلرین آزاد میشود. بسیاری از محصولات جانبی کلرین برای انسان و محیط زیست مضر است، بنابراین مصرف بیمالحظه ضد عفونی کننده های دارای کلرین، بویژه سفید کننده، بایستی اجتناب شود.

**استریلیزاسیون فیلتری:** محیط هایی که قابلیت اتوکالو ندارند باید به واسطه عبور از یک فیلتر غشایی با قطر منافذ  $0.22$  میکرومتر استریل شوند. این فیلترها در اندازه ها مختلف به منظور فیلتراسیون طیف وسیعی از مواد با حجم های مختلف طراحی شده اند. محیط های کشت، آنزیم ها، هورمون ها، کوفاکتور ها و بافرهای بیکربنات نمونه ای از این مواد غیر قابل اتوکالو هستند

# Cell culture laboratory

## Razi Herbal Medicines Research Center

استفاده از الکلها: اتانول (اتیل الکل)  $C_2H_5OH$ ، و ۲-پروپانول (ایزوپروپیل الکل)  $(CH_3)_2CHOH$ ، خصوصیات ضد عفونی مشابهی دارند. اینها بر علیه باکتریهای زنده، قارچها و ویروسهای واجد غشای لیپیدی موثر هستند اما بر اسپورها تاثیری ندارند. تاثیر آنها روی ویروسهای فاقد پوشش لیپیدی متغیر است. موثرترین غلظت مصرفی آنها حدود 70% (V/V) در آب است، غلظتهای بالاتر و پایینتر ممکن است میکروبوکش نباشند. یکی از نکات مثبت این محلولهای الکلی آن است که بقایای بر روی اجسام ضد عفونی شده باقی نمیگذارد. محلول الکل ۷۰٪ در آب میتواند روی پوست، میزکاری آزمایشگاه، هود بیولوژیک و همچنین غوطه ور کردن وسایل کوچک استفاده شود.

### موارد احتیاط:

- ✓ شستشوی دستها توسط الکل برای آلودگیزدایی دستهایی که خیلی آلوده نیستند در مواردیکه دستشوی مناسب در دسترس نباشد، توصیه میشود
  - ✓ بایستی به خاطر داشت که معرفهای الکلی در برابر اسپورها غیر موثر هستند ممکن است کلیه انواع ویروسهای فاقد پوشش لیپیدی را نکشد.
  - ✓ الکلها فرار و قابل اشتعال هستند و نباید نزدیک به شعله های روشن استفاده شوند
  - ✓ محلولهای کاری باید در ظروف مناسب نگهداری شده و از تبخیر الکلها اجتناب شود
  - ✓ بطریهای حاوی محلولهای الکلی باید بطور واضح لیبل دار باشند و از اتوکلاوینگ آنها اجتناب شود.
- استفاده از اشعه UV: پرتوی فرا بنفش بر علیه آلیه میکروارگانیسم ها شامل باکتریها، ویروس ها، قارچ ها، مخمرها و جلبکها در آب و هوای وسطوح موثر است. این اشعه روی ماده وراثتی میکروارگانیسم شامل DNA و RNA اثر گذاشته و باعث از هم پاشیدن آنها می شود. بنابراین تولید مثل میکروارگانیسم خاتمه می یابد.

### احتیاطات لازم:

- ✓ اثرات UV بر پوست شامل ایجاد لکه های پوستی و سرطان پوست می باشد همچنین موجب ورم چشم، آب مروارید و سوختگی شبکیه می شود.
- ✓ زمانی که از المپ UV به صورت دستی استفاده میکنید پوشاندن تمامی قسمتهای پوست با استفاده از روپوشهای بلند و دستکشها الزامی است.
- ✓ استفاده از عینک محافظ در زمان روشن بودن المپ UV الزامی است
- ✓ در صورت نیاز به باز کردن این المپها، دستها نباید چرب باشند و لامپ باید کامال خنک شده باشد
- ✓ حرکت دادن لامپهای داغ باعث انفجار و خروج بخار جیوه داخل آنها می گردد

## *Cell culture laboratory*

### *Razi Herbal Medicines Research Center*

#### **دستور العمل جلوگیری از آلودگی در اتاق کشت سلولی:**

- ۱- نظافت و تمیزی هفتگی کف آزمایشگاه با هیپوکلریت سدیم
- ۲- چک کردن فیلترهای هود لمینار در فواصل زمانی مناسب
- ۳- پاک کردن تمام سطح هود با الکل ۷۰ درصد قبل و پس از کار کشت
- ۴- تعویض هفتگی آب انکوباتور
- ۵- تمیز نمودن سطوح داخلی انکوباتور با دترجنت و الکل ۷۰ درصد
- ۶- اتوکالو ظروف شیشه ای قبل از استفاده
- ۷- بسته بودن درب اتاق
- ۸- عدم وجود وسایل غیر ضروری

#### **دستورالعمل نحوه ضد عفونی درموارد ریختن ویا شکستن ظروف محتوی مواد آلوده**

- ۱- ابتدا سریع محل را ترک کنید
- ۲- نفس خود را تا زمان خروج از محل نگه دارید
- ۳- روپوش ویا پوششهای حفاظتی را بپوشید و ماسک بزنید.
- ۴- مدتی صبر کنید تا آئروسولها ته نشست حاصل کنند(حداقل ۱۵ دقیقه)
- ۵- محل را با دستمال کاغذی ویا تنزیب بپوشانید.
- ۶- محلول ضد عفونی کننده مناسب را به آرامی در محل بریزید.
- ۷- بوسیله پنس قطعات شکسته را در داخل ظروف ایمن قرار دهید
- ۸- سپس محل را تمیز نموده ودر صورت لزوم مجددا با ماده ضد عفونی عمل فوق را تکرار نمائید.

# *Cell culture laboratory*

## *Razi Herbal Medicines Research Center*

**Log book** دستگاه ها: دفترچه ای میباشد که کاربر هر دستگاه موظف است پس از استفاده از دستگاه نام و نام خانوادگی، تاریخ و ساعت استفاده از دستگاه و نیز وضعیت دستگاه حین استفاده (سالم یا معیوب بودن احتمالی) را در آن یادداشت نماید.

### **چک لیست اتاق کشت در پایان هر روز:**

- ❖ نوشتن نام و نام خانوادگی در دفتر مخصوص
- ❖ جمع آوری وسایل اضافی از زیر هود، روی میزها و خارج کردن کیسه زباله
- ❖ مرتب کردن وسایل دائمی زیر هود
- ❖ خاموش کردن هود، سانتریفوژ، میکروسکوپ
- ❖ خاموش کردن کولر برق
- ❖ چک کردن  $CO_2$  و دمای انکوباتورها
- ❖ چک کردن درب یخچال ها
- ❖ قفل نمودن درب اتاق کشت
- ❖ نوشتن زمان و تاریخ خروج در دفتر مخصوص