- **دفریز سلول**

سلول ها در نیتروژن مایع نگهداری و در زمان مورد نظر مجددا ذوب شده و تحت کشت قرار می گیرند. در این روند دو امر حائز اهمیت ویژه است: ابتدا سرعت عمل و سپس کار کردن به صورت کاملا استریل. سلول هایی که از تانک ازت ۱۹۶°C- خارج می گردند بسیار حساسند و بسیاری از سلول ها در همین مرحله از بین می روند. مراحل کار به شرح زیر است:

۱. **در یک لوله ۱۵ ml ، ۵ml محیط کشت سلولی حاوی FBS ریخته می شود.**
۲. **کرایوویال مربوطه از تانک خارج و سریعا در آن تا حدی باز می گردد تا گاز ازت از آن خارج شود. پس از خروج گاز، در کرایوویال مجددا بسته می شود.**
۳. **انتهای کرایوویال منجمد حاوی سلول ها در بن ماری ۳۷°C قرار داده می شود.**
۴. **ویال به آرامی حرکت دورانی داده می شود.**
۵. **بلافاصله پس از آنکه بلور منجمد از دیواره داخلی ویال جدا شد، ویال به زیر هود منتقل می شود.**
۶. **ابتدا در ویال با دستمال کاغذی آغشته به الکل تمیز و سپس باز می شود. سوسپانسیون سلولی به صورت قطره قطره در لوله حاوی محیط کامل ریخته و به آرامی پیپتاژ می شود. سپس دیواره کرایوویال با ۱ml محیط شسته و مجددا به لوله منتقل می گردد.**
۷. **سپس لوله حاوی سلول ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰ g سانتریفوژ می شوند.**
۸. **پس از خارج نمودن محیط رویی، ۱ml محیط تازه حاوی FBS به سلول ها اضافه می شود تا به صورت سوسپانسیون درآیند.**
۹. **سلولها شمارش شده و درصد سلول های زنده تعیین می گردند.**

۱۰.پس از شمارش، محیط کشت کامل حاوی FBS ۲۰٪ به سلول ها اضافه شده و سوسپانسیون تهیه شده در داخل فلاسک و یا پلیت متناسب با تعداد سلول ریخته شده و در انکوباتور قرار می گیرد. به این ترتیب سلول ها روند رشد و تکثیر در داخل فلاسک/پلیت را آغاز می کنند.

- **شمارش سلول**

درصد سلول های زنده (viability) با رنگ آمیزی سلول توسط تریپان بلو تعیین می گردند. سلول های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر بوده و حال آنکه سلول های مرده رنگ را جذب می نمایند.

۱. **در ابتدا سوسپانسیون سلولی در حجم ۱ ml تهیه می شود.**
۲. **حجم ۲۰ میکرولیتر از تریپان بلو ۰.۲۵٪ و همان حجم از سوسپانسیون سلولی در یک حفره پلیت ۹۶ خانه ای ریخته و با هم به آرامی پیپتاژ می شوند.**
۳. **درحدود ۱۰ میکرولیتر از مخلوط روی لام نئوبار قرار داده شده و به زیر میکروسکوپ انتقال داده می شود.**
۴. **تعداد سلول های زنده و مرده در هر چهار سری خانه های شانزده تایی شمارش شده و میانگین گرفته می شود.**
۵. **تعداد کل سلولها در ۱ml از سوسپانسیون سلولی عبارتند از:**

تعداد سلول های شمارش شده در محدوده استاندارد مربوط به شمارش لوکوسیت ها در لام نئوبار × ۲ (ضریب رقت) × $۱۰^{۴}$ (ضریب حجم)

۶. تعداد سلول های زنده عبارتند از:

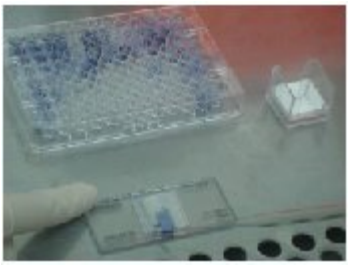
تعداد سلول های رنگ نگرفته و شفاف در هر چهار سری خانه های شانزده تایی شمارش شده و میانگین گرفته می شود.

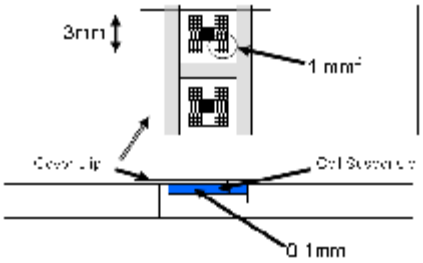
تعداد سلول های زنده در ۱ml از سوسپانسیون سلولی =

تعداد سلول های زنده شمارش شده در محدوده استاندارد مربوط به شمارش لوکوسیت ها در لام نئوبار ۲(ضریب رقت) × $۱۰^{۴}$ (ضریب حجم)

۷. درصد سلول های زنده عبارتند از: ۱۰۰ تعداد کل سلول ها/تعداد سلول های زنده = درصد سلول های زنده

۸. درصد سلول های مرده عبارتند از: درصد سلول های زنده – ۱۰۰ = درصد سلول های مرده





- پاساژ سلول

سلول ها برای رشد نیازمند مواد مغذی و فضای کافی و خروج مواد زائد می باشند. هنگامی که تعداد سلول ها در داخل فلاسک بیش از حد گردد، سلول از لحاظ موارد فوق دچار مشکل می شوند و در نتیجه نیازمند جای بیشتر بوده و در این مرحله سلول ها باید پاساژ داده شوند. تراکم در حدود ۸۰٪ سلول ها در داخل بستر فلاسک/پلیت برای پاساژ سلولی مناسب است. مراحل کار به صورت ذیل می باشد:

❖ پاساژ سلول های چسبنده

۱. محیط کشت فلاسک کاملا تخلیه و سطح سلول ها یکبار باحجم کمی PBS به آرامی شسته می شوند.

۲. پس از خارج کردن PBS ، به منظور جدا شدن سلول ها از کف فلاسک، آنزیم تریپسین ۰.۲۵٪-۰.۰۵٪ همراه باEDTA به فلاسک اضافه می شود (درحدی که کف فلاسک را بپوشاند) و در دمای ۳۷°C به مدت ۵-۲ دقیقه انکوبه می گردد .مدت زمان انکوباسیون به نوع سلول ارتباط دارد.

۳. سپس فلاسک از انکوباتور خارج شده و پس از اطمینان از جدا شدن سلول ها از بستر خود با مشاهده در زیر میکروسکوپ، محیط کشت حاوی FBS به فلاسک اضافه می شود تا اثر تریپسین خنثی گردد.

۴. بعد از پیپتاژ، سلول های جدا شده از کف فلاسک به یک لوله فالکون استریل ۱۵ ml منتقل می شوند.

۵. لوله حاوی سلول ها به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰ g سانتریفوژ می شود.

۶. محیط روی سلول ها تخلیه شده و محیط جدید اضافه می گردد.

۷. پس از پیپتاژ، سوسپانسیون سلولی بین چند فلاسک جهت تکثیر تقسیم و مابقی پس از سانتریفوژ مجدد و افزودن محیط مخصوص انجماد، منجمد (Freeze) و ذخیره می شوند. تعداد سلولهای منتقل شده به نوع رده سلولی ارتباط دارد.

۸. محیط داخل هر فلاسک با محیط کشت تازه حاوی FBS به حجم مطلوب رسانده می شود.

❖ پاساژسلول های شناور

۱. سوسپانسیون سلولی پس از پیپتاژ از داخل فلاسک به لوله فالکون استریل ۱۵ میلی لیتر منتقل می گردد.

۲. لوله حاوی سلول ها به مدت ۵ دقیقه در g ۱۳۰ سانتریفوژ می شود.

۳. محیط روی سلول ها خالی شده و محیط جدید افزوده می شود و دوباره سوسپانسیون سلولی تهیه می گردد.

۴. شمارش سلولی انجام گردیده و بسته به تعداد سلول ها بین چند فلاسک تقسیم می شوند.

۵. محیط کشت تازه داخل هر فلاسک به حجم مناسب اضافه می شود.

- انجماد سلول

ذخیره سازی سلول ها در تانک ازت امکان استفاده از سلول ها را برای مدت طولانی فراهم می سازد. انجماد سلولی به دو روش صورت می گیرد:

۱. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی، شمارش سلولی انجام شده و viability سلول ها تعیین می گردد.

۲. براساس تعداد سلول ها تصمیم گیری می شود که نیاز به چند کرایو ویال است.

۳. مشخصات سلول از جمله نام سلول، تعداد سلول، میزان viability، شماره پاساژ، نام فرد فریز کننده و تاریخ فریز در روی لوله کرایو نوشته می شود.

۴. سپس در یک لوله جداگانه مقدار لازم از FBS حاوی DMSO ۱۰٪ تهیه می گردد.

۵. حدودا به ازای هر $۱۰^{۶}$ ۲-۱ سلول از سوسپانسیون سلولی FBS ۰/۵ml حاوی ۱۰٪-۵٪ DMSO به رسوب سلول هاافزوده می گردد و پس از پی پتاژ ، تقسیم و به سرعت به فریزر انتقال می یابد.

۶. کرایو حاوی سوسپانسیون سلولی به مدت ۲ ساعت به فریزر ۲۰°C- و سپس به فریزر ۸۰°C- انتقال می یابد.

۷. بعد از گذشت ۶ ساعت (این زمان می تواند ۱۲ تا ۴۸ ساعت نیز تداوم داشته باشد)، سلول های یخ زده به تانک نیتروژن (۱۹۶°C-) منتقل می شوند.

- نکات:

تمامی مراحل دفریز سلول، از خارج نمودن سلول ها از تانک ازت تا رساندن حجم محیط به ۷ ml بیشتر از ۵ دقیقه به طول نمی انجامد.

مدت زمان انکوباسیون در پاشاژ سلول های چسبنده با توجه به سلول مورد نظر تغییر می یابد.

DMSO و ترپان بلو موادی بسیار سمی هستند. در حین کار می باید از تماس آن ها با لباس، دستکش، صورت و چشمها جدا خودداری نمود.