اتاق کشت سلولی (انکوباتور)

انکوباتور **اتاق کشت سلولی** قلب یک آزمایشگاه کشت بافت است. این دستگاه با فراهم کردن شرایط محیطی پایدار (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت بالا و ۵٪ دی‌اکسید کربن)، امکان رشد و تکثیر سلول‌ها را در خارج از بدن موجود زنده فراهم می‌کند .

---

۱. هدف و کاربرد(Purpose and Applications)

انکوباتور CO_2 برای **کشت و نگهداری سلول‌های پستانداران** در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی طراحی شده است. این دستگاه محیطی استریل و پایدار را از نظر دما، رطوبت و گاز دی‌اکسید کربن فراهم می‌کند.

کاربردهای اصلی در آزمایشگاه:

- **کشت سلول‌های بنیادی :**پرورش سلول‌های بنیادی جنینی، پرتوان القایی(iPSC) ، مزانشیمی و پیش‌سازها
- **کشت سلول‌های چسبنده :(Adherent Cells)** سلول‌هایی که به کف فلاسک می‌چسبند و به صورت تک لایه رشد می‌کنند
- **کشت سلول‌های سوسپانسیون :(Suspension Cells)** سلول‌هایی که در محیط مایع شناور هستند
- **پاساژ سلولی :(Subculture)** تکثیر و انتقال سلول‌ها به فلاسک‌های جدید
- **نگهداری طویل‌مدت :**ذخیره‌سازی سلول‌ها در شرایط استاندارد بین آزمایش‌ها

---

۲. اجزای اصلی و اصول عملکرد(Components & Working Principle)

پارامترهای محیطی استاندارد

پارامتر	مقدار استاندارد	محدوده قابل قبول
دما(Temperature)	۳۷ درجه سانتی‌گراد	۳۶ تا ۳۸ درجه سانتی‌گراد
CO_2	۵٪	۴ تا ۶٪
رطوبت نسبی(Relative Humidity)	۷۰٪<	۹۰-۹۵٪ ایده‌آل

اجزای اصلی دستگاه

جزء(Component)	توضیح و عملکرد
محفظه داخلی(Chamber)	فضای استریل و ایزوله از جنس استیل ضدزنگ که فلاسک‌های سلولی در آن قرار می‌گیرند.
سیستم گرمایش (Heating System)	گرمایش هوایی (Air-Jacketed) یا آبی (Water-Jacketed) برای حفظ دمای پایدار.
سنسور CO_2	معمولاً از نوع مادون قرمز (IR) که غلظت گاز را اندازه‌گیری و تنظیم می‌کند.
سیستم رطوبت‌سازی (Humidification)	یک سینی آب (Water Pan) در کف دستگاه که تبخیر شده و رطوبت مورد نیاز را تأمین می‌کند.
سنسور دما (Temperature Sensor)	دمای داخل محفظه را پایش و به سیستم کنترل گزارش می‌دهد.
فیلتر HEPA	)در مدل‌های پیشرفته) هوای در حال گردش را فیلتر کرده و از آلودگی جلوگیری می‌کند.
نمایشگر و کنترل‌پنل	برای نمایش مقادیر لحظه‌ای و تنظیم پارامترها.

اهمیت هر پارامتر

- **دما(۳۷° C(:** دمای بدن انسان. سلول‌های پستانداران برای رشد ایده‌آل به این دما نیاز دارند.
- **(۵٪CO_2 :)** برای حفظ pH محیط کشت (که معمولاً با بیکربنات سدیم بافر شده است) ضروری است CO_2 .با آب واکنش داده و اسید کربنیک تشکیل می‌دهد که pH را تنظیم می‌کند.
- **رطوبت>(۷۰٪ :)** از خشک شدن و تبخیر محیط کشت جلوگیری می‌کند. کمبود رطوبت باعث افزایش اسمولاریته محیط و مرگ سلول‌ها می‌شود.

---

۳. روش کار گام به گام(Step-by-Step Procedure)

♡مرحله ۰: قوانین طلایی اتاق کشت سلول

این قوانین از مستندات استاندارد دانشگاه کالیفرنیا، ریورساید استخراج شده است:

قانون	توضیح
استریل کاری مطلق	تمام کارها باید با تکنیک استریل و در کنار هود لامینار (Biosafety Cabinet) انجام شود.
شستشوی دست‌ها	قبل و بعد از ورود به آزمایشگاه، دست‌ها را با صابون آنتی‌باکتریال بشویید.

تجهیزات حفاظت فردی	روپوش آزمایشگاهی، دستکش، سرپوش کفش و در صورت نیاز ماسک بزنید.
ممنوعیت مواد غذایی	خوردن، آشامیدن، آدامس جویدن و استفاده از لوازم آرایشی در محیط کشت سلول ممنوع است.
گوشی موبایل ممنوع	حین کار با سلول‌ها از گوشی استفاده نکنید و با دستکش به گوشی دست نزنید.
درهای بسته	درب اتاق کشت سلول هنگام کار با مواد BSL-2 بسته باشد.

مرحله ۱: آماده‌سازی قبل از کار(Pre-Work Preparation)

۱. از تمیز و ضدعفونی بودن هود لامینار اطمینان حاصل کنید. سطوح کار را با اتانول ٪۷۰ ضدعفونی کنید.
۲. تمام لوازم مورد نیاز) پیپت، فلاسک، محیط کشت، PBS، تریپسین (را داخل هود قرار دهید.
۳. ظروف حاوی محیط کشت و محلول‌ها را قبل از ورود به هود، با اتانول ٪۷۰ اسپری کنید.
۴. دستکش‌های خود را با اتانول ٪۷۰ اسپری کنید.
۵. انکوباتور را باز کنید (ترجیحاً با دستکش و نه با دست خالی).

مرحله ۲: کار با سلول‌های چسبنده(Adherent Cells)

این روش بر اساس SOP استاندارد مرکز سرطان فردریک (NCI) تهیه شده است.

برای پاساژ سلول:(Subculture)

۱. فلاسک حاوی سلول‌ها را از انکوباتور خارج کرده و داخل هود لامینار قرار دهید.
۲. محیط کشت رویی (Supernatant) را با استفاده از سیستم آسپیراسیون تخلیه کنید.
۳. برای شستشو،) PBSمحلول نمکی فسفات بافر بدون کلسیم و منیزیم) به فلاسک اضافه کنید:
   - فلاسک :T25 ۵ میلی‌لیتر
   - فلاسک :T75 ۱۰ میلی‌لیتر
۴. PBSرا تخلیه کنید. این مرحله را یک یا دو بار تکرار کنید (برای حذف آثاری از سرم که تریپسین را مهار می‌کند).
۵. محلول تریپسین EDTA/را اضافه کنید:
   - :T25۰٫۵ میلی‌لیتر
   - :T75۱ میلی‌لیتر
۶. فلاسک را به آرامی تکان دهید تا تمام سطح سلول‌ها با تریپسین پوشانده شود.
۷. فلاسک را به مدت **۲ تا ۵ دقیقه** در انکوباتور (یا روی میز در دمای اتاق) قرار دهید.
۸. فلاسک را خارج کرده و به آرامی به کناره آن ضربه بزنید (Tap) تا سلول‌ها از سطح جدا شوند.
۹. سلول‌ها را با افزودن **حجم مساوی محیط کشت کامل حاوی سرم)** که تریپسین را غیرفعال می‌کند) جمع‌آوری کنید.
۱۰. با پیپت، سلول‌ها را چند بار بالا و پایین ببرید تا توده‌ها (Clumps) پراکنده شوند.
۱۱. سوسپانسیون سلولی را به فلاسک(های) جدید منتقل کنید و محیط کشت تازه اضافه کنید.
۱۲. فلاسک را برچسب‌گذاری کنید (نوع سلول، تاریخ، پاساژ شماره).
۱۳. درب فلاسک را کمی شل کنید (اگر دریچه تنفسی ندارد) و در انکوباتور قرار دهید.

مرحله ۳: کار با سلول‌های سوسپانسیون(Suspension Cells)

۱. فلاسک را از انکوباتور خارج کرده و داخل هود قرار دهید.
۲. سلول‌ها را با پیپت زدن (Pipetting) به آرامی هم بزنید تا یکنواخت شوند (چون سلول‌ها ته نشین می‌شوند).
۳. حجم مورد نیاز از سوسپانسیون سلولی را به فلاسک جدید منتقل کنید.
۴. محیط کشت تازه اضافه کنید.
۵. برچسب‌گذاری کرده و در انکوباتور قرار دهید.

مرحله ۴: قرار دادن سلول‌ها در انکوباتور

۱. فلاسک را با احتیاط درون محفظه انکوباتور قرار دهید.
۲. از قرار گرفتن فلاسک‌ها روی هم یا جلوگیری از جریان هوا خودداری کنید.
۳. درب انکوباتور را محکم ببندید.
۴. پارامترهای نمایش داده شده) دما، CO_2) را بررسی کنید تا در محدوده استاندارد باشند.

مرحله ۵: خروج و پایان کار(Shutdown)

۱. پس از اتمام کار، تمام سطوح داخل هود را با اتانول ٪۷۰ تمیز کنید.
۲. زباله‌های بیولوژیک (دستکش، پیپت، فلاسک‌های آلوده) را در کیسه زباله زرد (اتوکلاو) بیندازید.
۳. دستکش خود را تعویض کرده و اتاق را ترک کنید.

---

۴. نگهداری و تمیزکاری

(Maintenance & Cleaning)

روتین روزانه

کار	روش اجرا
بررسی پارامترها	دما) ۳۷° (C و) CO_2 ٪۵ (را کنترل کنید.
بررسی سطح آب سینی	اطمینان حاصل کنید سینی آب خالی نیست.

روتین هفتگی

کار	روش اجرا
پر کردن آب سینی	۱-۲ لیتر آب مقطر استریل) اتوکلاو شده، نوع (II به سینی اضافه کنید . از آب دیونیزه (Type I) استفاده نکنید.
تمیزکاری نشتی	در صورت مشاهده نشتی یا لکه، با اتانول ٪۷۰ تمیز کنید.

روتین ماهانه

کار	روش اجرا
تمیزکاری کامل	۱ .محتویات را به انکوباتور دیگر منتقل کنید. ۲ .قفسه‌ها و قطعات متحرک را خارج کنید. ۳ .سینی آب را خالی کرده و با اتانول ٪۷۰ تمیز کنید. ۴ .تمام سطوح داخلی را با اتانول ٪۷۰ یا مواد ضدعفونی‌کننده آزمایشگاهی مناسب تمیز کنید. ۵ .سینی را با آب مقطر استریل پر کنید و دوباره نصب کنید.

ضدعفونی عمیق - (Decontamination) در صورت آلودگی

برخی انکوباتورها دارای سیکل ضدعفونی داخلی هستند که با حرارت (Heat Decon) کار می‌کند.

روش سیکل حرارتی ۱۴۵ درجه سانتی‌گراد (روش خشک):

- تمام محتویات را خارج کنید
- سینی آب را خالی کنید
- سنسور RH را خارج کنید (مدل‌های خاص)
- سیکل ضدعفونی را از پنل دستگاه فعال کنید
- کل فرآیند حدود **۸ ساعت** طول می‌کشد

روش سیکل حرارتی ۹۵ درجه سانتی‌گراد (روش مرطوب):

- برای مدل‌های با سنسورهای حساس مناسب‌تر است
- سینی آب را با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب پر کنید
- حدود **۱۴ ساعت** طول می‌کشد

هشدار جدی :در حین سیکل ضدعفونی، درب خارجی را باز نکنید. دمای سطوح داخلی به ۹۵° C یا ۱۴۵° C می‌رسد و تماس با آنها باعث سوختگی شدید می‌شود.

---

۵. عیب‌یابی مشکلات رایج(Troubleshooting)

مشکل	علت احتمالی	راه‌حل
نوسان دما	درب مکرراً باز می‌شود. سیستم گرمایش معیوب.	تعداد دفعات باز کردن درب را کاهش دهید. با تکنسین تماس بگیرید.
مقدار CO_2 نوسان دارد	درب به درستی بسته نشده. سیلندر CO_2 خالی یا نزدیک به اتمام. سنسور CO_2 کثیف.	درب را محکم ببندید. سیلندر را تعویض کنید. سنسور را تمیز کنید (طبق دفترچه).
بوی نامطبوع داخل دستگاه	آلودگی قارچی یا باکتریایی. سینی آب کثیف.	سینی آب را تمیز کرده و آب تازه بریزید. سیکل ضدعفونی حرارتی اجرا کنید.
رشد کند سلول‌ها	دما یا CO_2 تنظیم نادرست. محیط کشت تاریخ مصرف گذشته. آلودگی مایکوپلاسما.	پارامترها را چک کنید. محیط تازه تهیه کنید. نمونه را از نظر مایکوپلاسما تست کنید.
تغییر رنگ محیط کشت (صورتی به زرد)	افزایش CO_2) کاهش .(pH آلودگی باکتریایی.	CO_2را بررسی کنید. نمونه را از نظر آلودگی بررسی کنید. محیط را عوض کنید.

---

۶. چک‌لیست سریع برای کاربران(Quick Checklist)

مرحله	اقدام	انجام شد؟
۱	دستکش، روپوش و سرپوش کفش پوشیده شده؟	☐
۲	سطوح هود با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی شده؟	☐
۳	تمام ظروف قبل از ورود به هود با اتانول اسپری شده‌اند؟	☐
۴	انکوباتور روشن و پارامترها) ۳۷°C، ۵٪ CO_2) بررسی شده؟	☐
۵	فلاسک سلولی با احتیاط از انکوباتور خارج و داخل هود قرار داده شده؟	☐
۶	تمام مراحل پاساژ سلول (آسپیراسیون، شستشو، تریپسین، غیرفعال‌سازی) طبق SOP انجام شده؟	☐
۷	فلاسک جدید برچسب‌گذاری (نوع سلول، تاریخ، پاساژ شماره) شده؟	☐
۸	فلاسک در انکوباتور قرار داده شده و درب محکم بسته شده؟	☐
۹	زباله‌های بیولوژیک در کیسه زرد اتوکلاو ریخته شده؟	☐
۱۰	سطوح هود دوباره با اتانول تمیز شده و چراغ UV روشن شده (در صورت وجود)؟	☐

✨جمع‌بندی نهایی

انکوباتور CO_2 قلب تپنده هر آزمایشگاه کشت سلول است. با رعایت اصول زیر می‌توانید سلول‌های سالم و عاری از آلودگی داشته باشید:

۱. **استریل کاری مطلق** - تمام مراحل را در هود لامینار انجام دهید

۲. **پارامترهای صحیح** - دما، CO_2و رطوبت را در محدوده استاندارد نگه دارید
۳. **نگهداری منظم** - هفته‌ای سینی آب را پر کنید، ماهانه دستگاه را تمیز کنید
۴. **ضدعفونی دوره‌ای** - در صورت آلودگی، سیکل حرارتی را اجرا کنید