مهارت‌های زیست فناوری ۱

کشت بافت گیاهی

از مجموعه کتاب‌های زیست فناوری در مدرسه

نرگس ابدالی

کتایون صداقتی زاده

دکتر محسن آسوری

نشر راشدین

مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی

دانشگاه علوم پزشکی لرستان

سرشناسه : - ابدالی، نرگس، ۱۳۶۰-
عنوان و نام پدیدآور : مهارت زیست‌فناوری۲: تکنیک‌های مولکولی کار با DNA (استخراج DNA، PCR و الکتروفور) / مولفان کتایون صداقتی‌زاده، نرگس ابدالی، محسن آسوری.
مشخصات نشر : تهران : انتشارات راشدین، ۱۳۹۸.
مشخصات ظاهری : ۱۰۰ ص.: مصور(رنگی)، جدول(رنگی).
فروست : از مجموعه کتابهای زیست‌فناوری در مدرسه(ویژه مدرسان و کارگاههای تخصصی)
شابک : ۹-۶۶۳-۳۶۱-۶۰۰-۹۷۸
وضعیت فهرست نویسی : فیپا
موضوع : تکنولوژی زیستی -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع : Biotechnology -- Laboratory manuals
موضوع : دی. ان. ا. -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع : DNA -- Laboratory manuals
موضوع : الکتروفورز -- دستنامه‌های آزمایشگاهی
موضوع : Electrophoresis -- Laboratory manuals
شناسه افزوده : صداقتی‌زاده، کتایون، ۱۳۵۷
شناسه افزوده : آسوری، محسن، ۱۳۵۱ -
رده بندی کنگره : ۱۳۹۸/TP۲۴۸ ۸۷م۴ص۲/
رده بندی دیویی : ۶/۶۶۰
شماره کتابشناسی ملی : ۵۶۲۰۲۰۴

انتشارات راشدین
عنوان کتاب: مهارت‌های زیست فناوری ۱
مؤلف: نرگس ابدالی، کتایون صداقتی زاده، دکتر محسن آسوری
تصویرگر: محسن یزدان زاد
نوبت چاپ: اول– ۱۳۹۸
شمارگان: ۱۰۰۰
شابک: 978-600-361-663-9

قیمت: ۱۲۰۰۰۰ ریال
نشانی: میدان انقلاب – کارگر جنوبی– بن‌بست گشتاسب – پلاک ۴ واحد ۶
تلفن/ نمابر: ۶۶۴۰۸۲۲۴ – ۶۶۱۲۳۴۴۹
پایگاه اینترنتی: www. siteketab. com پست الکترونیک: rashed1829@yahoo. Com

فهرست

مبحث اول

معرفی زیست فناوری ۱۱

مبحث دوم

کشت بافت گیاهی ۱۸

مبحث سوم

اخلاق و ایمنی در پژوهش ٤۰

پیوست ها ٥۱

معرفی ابزارها و دستگاه ها ٥۱

منابع ٦۲

پیشگفتار

قبل از شروع لازم است چند نکته را با شما در میان بگذاریم، همانطور که می‌دانید زیست فناوری دامنه وسیعی دارد و لزوما نیازی نیست هر فرد تمام مهارت‌های آنرا بداند بلکه بر اساس علاقه و نیاز خود مهارت یا مهارت‌هایی را فرا گرفته و مورد استفاده قرار می‌دهد. بعنوان مثال کسی که نشانگر مولکولی کار می‌کند ممکن است هرگز نیاز به یادگیری کشت بافت یا سلول نداشته باشد. به همین علت ما کتاب‌های مهارت را بر اساس موضوع از هم تفکیک نموده ایم. اما برخی مباحث مانند معرفی زیست فناوری، اخلاق و ایمنی در پژوهش بطور مشترک در تمام کتاب‌های مهارت وجود دارد. در پایان این کتاب‌ها بخشی بنام پیوست

وجود دارد که در این بخش به معرفی ابزارها و موادی که در طی کتاب به آنها اشاره شده است می‌پردازد.

مهارت آموز عزیز بخاطر داشته باشید، انجام آزمایشات کتاب‌های مهارت نیاز به آزمایشگاه‌های تخصصی زیست فناوری دارد و آزمایش‌ها حتما باید با نظارت کارشناس متخصص هر موضوع انجام شود.

در اینجا لازم است از زحمات خانم فاطمه یحیی زاده در طراحی، اجرا و بهینه سازی آزمایش کشت بافت تشکر نمائیم.

موفق باشید

راه‌های ارتباط با مؤلفین:

آدرس ایمیل: nargessabdali6090@gmail.com

وب سایت: http://stbiotech.ir

جدول سطح بندی کتاب‌های زیست فناوری بر اساس مقطع تحصیلی/ سنی

سطح	عنوان کتاب	گروه هدف	محل برگزاری	مهارت‌های کسب شده	معرفی کتاب	اهداف
سطح اول **"توجه به طبیعت"**	کتاب شعر و موسیقی	دانش آموزان پیش دبستانی و کلاس اول	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با طبیعت و نقش موجودات زنده در حفظ طبیعت	نگاه هدفدار به بعضی موجودات زنده از طریق شعر و موسیقی	شناخت طبیعت و کشف جایگاه موجودات زنده
سطح دوم **"توجه به طبیعت"**	کودک، طبیعت، زیست فناوری	دانش آموزان کلاس پایه دوم و سوم دبستان	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با موجودات زنده و نقش آنها در زندگی انسانها	ایجاد علاقمندی در دانش آموزان از طریق بازی و نقاشی	افزایش خلاقیت و ابتکار
سطح اول "زیست فناوری"	کتاب آشنایی با زیست فناوری	دانش آموزان پایه چهارم و پنجم	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با کاربردهای زیست فناوری از طریق فعالیت‌های عملی	آشنایی با بیوتکنولوژی سنتی و نقش زیست فناوری در عصر حاضر	افزایش دقت در مشکلات و معضلات پیرامون
سطح دوم "زیست فناوری"	کتاب مبانی زیست فناوری	دانش آموزان پایه ششم و هفتم	مدارس و پژوهشسراها	انجام آزمایش‌های علمی و فعالیت‌های زیست فناوری	کسب مهارت در ارائه ایده‌های خلاقانه و علمی	افزایش روحیه پرسشگری و کنجکاوی توانمندی در ارائه فرضیه‌های کاربردی

سطح سوم "زیست فناوری"	کتاب زیست فناوری میکروبی	دانش آموزان پایه هفتم و هشتم و نهم	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با آزمایش ها، ابزارهای مطالعه میکروبی و اهمیت میکروب‌ها در زندگی انسانها	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های علمی و انجام آن	توانمندی در آزمایش فرضیه‌ها و نتیجه گیری
سطح سوم "زیست فناوری"	زیست فناوری غذایی	دانش آموزان پایه هفتم و هشتم و نهم	مدارس و پژوهشسراها	آشنایی با محصولات غذایی پروبیوتیک و پری بیوتیک	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های علمی و انجام آن	توانمندی در آزمایش فرضیه‌ها و نتیجه گیری
سطح چهارم "زیست فناوری"	مهارت ۱ کشت بافت گیاهی الکتروفورز	مدرسان و دانش آموزان پایه نهم، دهم و یازدهم	آزمایشگاه تخصصی با حضور کارشناس	آشنایی با تکنیک‌های آزمایشگاهی	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های تخصصی و انجام آن	توانمندی در آزمایش فرضیه‌ها و نتیجه گیری
	مهارت ۲ استخراج DNA، PCR و الکتروفورز	مدرسان و دانش آموزان پایه نهم، دهم و یازدهم	آزمایشگاه تخصصی با حضور کارشناس	آشنایی با تکنیک‌های آزمایشگاهی (در آزمایشگاه‌های تخصصی)	کسب توانایی در ارائه پروژه‌های تخصصی و انجام آن	
-------	زیست فناوری به زبان ساده (ویژه والدین)	والدین و مدرسان	---------	آشنایی والدین، معلمان، مدیران و عموم علاقمندان		

عنوان کتاب : مهارت زیست فناوری ۱ کشت بافت گیاهی	
سطح کتاب	عالی (از مجموعه کتاب‌های مهارت)
هدف	آشنایی با تکنیک کشت بافت گیاهی
گروه مخاطب	مدرسان و کارگاه‌های تخصصی دانش‌آموزی
محل مجاز برگزاری	آزمایشگاه‌های تخصصی
مدت دوره	مقدماتی: ۸ ساعت (پیوسته) انتظارات: مشاهده مسیر کشت بافت و آشنایی با مفاهیم و تجهیزات پیشرفته: ۲۴ ساعت (ناپیوسته) انتظارات: اجرای عملی تمام مراحل توسط مهارت آموز و تسلط به تکنیک ارائه شده در کتاب حاضر

مبحث اول
معرفی زیست فناوری

واژه بیوتکنولوژی که معادل فارسی آن زیست فناوری است، اولین بار در سال ۱۹۱۹ توسط آقای کارل ارکی[۱] به کار گرفته شد. آقای ارکی یک مهندس کشاورزی مجارستانی بود که برای اولین بار بر روی مجموعه‌ای از فرآیندها که در این کتاب با آنها بیشتر آشنا می‌شوید یک نام پر محتوا گذاشت؛ اما سابقه استفاده از زیست فناوری به چند هزار سال قبل بر می‌گردد، زمانیکه بشر از فرآیند تخمیر در تهیه سرکه، الکل، نان و ... استفاده می‌کرد.

در دنیای امروز زیست فناوری به ابزاری پرقدرت برای حل مشکلات در تمام شاخه های علوم زیستی و پزشکی تبدیل شده است. به جرأت می توان ادعا کرد که در حال حاضر هیچ شاخه ای از علوم زیستی بی نیاز از زیست شناسی مولکولی نیست و اگر قرار باشد، علمی پاسخگوی نیازهای زیستی بشر باشد بدون شک آن علم زیست شناسی مولکولی است که زیست فناوری از آن بهره‌های فراوانی می‌برد.

واژه بیوتکنولوژی ترکیبی از دو کلمه **بیو** به معنای "زیست" و **تکنولوژی** به معنای "فن آوری" است. معادل فارسی **بیوتکنولوژی** واژهٔ " **زیست**

---

۱ Karl Ereky

فناوری" است. "زیست" به کلیه فرآیندهای حیاتی دلالت دارد و "تکنولـوژی یا فناوری" به طیف وسیعی از ابزار، فنون، اصول و فرآیندها اشاره دارد.

تقسـیم‌بنـدی زیسـت فنـاوری بـه شـاخه‌هـای مختلـف، برحسـب دیـدگاه متخصصین و دانشمندان مختلف متفاوت است. در رایج ترین تقسیم‌بندی، از نام علوم مختلف با پیشوند زیست فناوری استفاده می‌کنند و نام شاخه‌های زیسـت فناوری را بدین ترتیب وضع می‌کنند. مانند زیست فناوری پزشکی که از تلاقـی بیوتکنولوژی با علم پزشکی بوجود آمده است، یا زیست فناوری کشـاورزی کـه کاربرد زیست فناوری در کشاورزی را نشان می‌دهد. بـدین ترتیـب مـی‌تـوان از زیست فناوری داروئی، زیست فناوری میکروبی، زیست فناوری دریـا، زیسـت فناوری قضائی یا پزشکی قانونی، زیست فناوری غذائی، زیست فناوری صنعتی، زیست فناوری نفت، زیست فناوری تشخیصی و ... نام برد.

گستردگی کاربرد زیست فناوری در قرن بیست و یکم بـه حـدی اسـت کـه اقتصاد، بهداشت، درمان، محیط زیست، آمـوزش، کشـاورزی، صـنعت، تغذیـه و سایر جنبه‌های زندگی بشر را تحت تأثیر شگرف خود قرار خواهد داد. به همـین دلیل اندیشمندان جهان قـرن بیسـت و یکـم را قـرن بیوتکنولـوژی نامگـذاری کرده‌اند.

شکل۱- ارتباط زیست فناوری با علوم مختلف

تاکنون دقت کرده اید چرا نمی‌گوئیم علم زیست فناوری؟

آیا بین دو واژه **علم** با **تکنولوژی** تفاوت وجود دارد؟

اکثر مردم این دو واژه را معادل هم می‌دانند. حتی برخی به اشتباه می‌گویند علم زیست فناوری و یا علم نانوتکنولوژی!! اما در واقع واژه‌های **"علم"** و **"تکنولوژی"** متفاوت هستند.

حرکت علم از مسائل خاص به طرف مسائل عام است و طی آن سعی دارد با کشف ارتباطات گسترده‌تر به توضیح هر پدیده بپردازد.

در صورتی که تکنولوژی (فناوری) در جهت عکس حرکت می‌کند، یعنی با استفاده از قوانین و اصول عمومی (که در مرحله شکل گیری و توسعه علم بدان‌ها دست یافته است) سعی می‌کند مسائل خاص را حل کند.

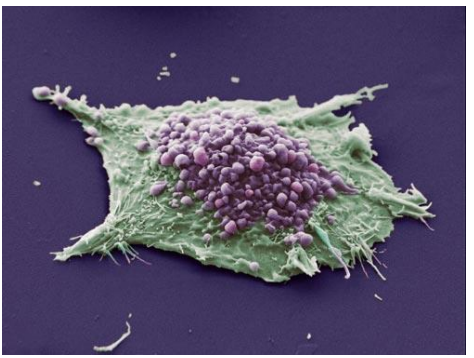
به عنوان مثال وقتی اولین بار دانشمند انگلیسی «رابرت هوک» در قرن هفدهم موفق به دیدن سلول بافت چوب پنبه در زیر اولین میکروسکوپ شد، واقعا نمی‌دانست چه می‌بیند و این سئوال مطرح شد که **این چیست؟**

شکل ۲- اولین میکروسکوپ

هوک سپس به بررسی سایر چیزهای زنده و غیر زنده برای توجیه مشاهده خود پرداخت. به عبارتی از **جزء** (یک ۶ ضلعی مشاهده شده در چوب پنبه) به سمت **کل** (وجود سلول در سایر بافت‌ها وموجودات) حرکت کرد.

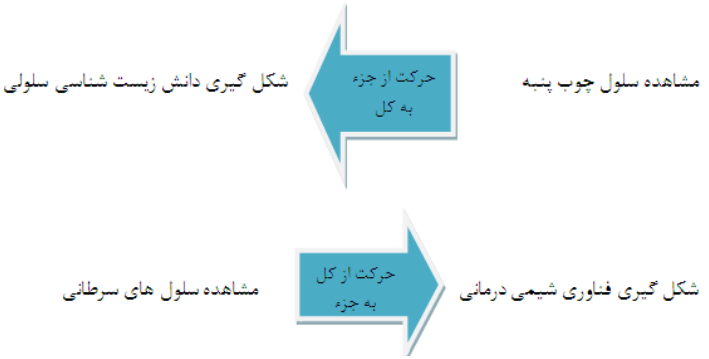
نتیجه این حرکت شکل گیری علم زیست شناسی سلولی بود.

اما با گذشت زمان محققین متوجه شدند یک بی‌نظمی در تکثیر برخی سلول‌ها بوجود می‌آید. این بی‌نظمی باعث می‌شود که این سلول‌ها بیش از حد تکثیر شوند، این تکثیر بی‌رویه را سرطان می‌نامند. بعد از این مشاهده، این سئوال مطرح شد که برای جلوگیری از این تکثیر بی‌رویه **چه باید کرد؟**



شکل ۳- سلول سرطانی

این سئوال زمینه را برای ابداع یک تکنولوژی مثل شیمی درمانی فراهم کرد. در اینجا ما از یک کل (علم زیست شناسی سلولی) بطرف یک جزء (درمان یک گروه خاص از سلول ها) حرکت کرده ایم. به عبارت دیگر، شناخت ما از ماهیت سلولی موجودات زنده، علم زیست شناسی سلولی را بوجود آورد و وقتی یک گروه از این سلول‌ها در رشد و تکثیر خود از قوانین کلی تبعیت نکردند، شیمی درمانی شکل گرفت.



شکل۴- تفاوت علم و فناوری

با این توضیح حتما متوجه شده اید که زیست فناوری، علم نیست بلکه فناوری است که با استفاده از قوانین علمی موجود سعی دارد مشکلات بشر را رفع نماید. تعاریف گسترده‌ای برای زیست فناوری ارائه شده است. یکی از کامل‌ترین این تعاریف می‌گوید: " هر گونه استفاده از موجودات زنده (یا بخش‌هایی از موجودات زنده مانند بافت و سلول) برای ایجاد یک فرآورده و یا تغییر یک محصول، بهبود حیوان و گیاه و یا ایجاد ریز سازواره ها[1] برای استفاده بشر و تأمین رفاه وی زیست فناوری نام دارد."

به زبان ساده تر:

" استفاده از موجودات زنده برای ساخت فرآورده‌هایی که نیازهای انسانی را رفع کنند یا انسان را به اهداف خود برساند"

---

۱ Microorganisms

حال که با مفهوم زیست فناوری بیشتر آشنا شدید و می‌خواهید

دانش‌آموز محقق زیست فناوری

باشید، آیا می‌توانید مثال‌هایی از "علم" و تکنولوژی" در محیط اطراف

خود بیابید؟

مبحث دوم
کشت بافت گیاهی

کشت بافت گیاهی

کشت بافت گیاهی عبارت است از «کشت سلول، اندام و بافت‌های گیاهی در محیط کشت مصنوعی تحت شرایط استریل».

آقای هابرلنت فیزیولوژیست گیاهی آلمانی، به عنوان پدر کشت بافت گیاهی شناخته می‌شود که نظریه بنام **توتی پتنسی** [1] **یا بازیابی فراگیر** در سال ۱۹۰۲ ارائه کرد. **بازیابی فراگیر** (باززایی) به معنای توانایی یک سلول در ایجاد بافت‌های مختلف و در نهایت ایجاد یک گیاه کامل تحت شرایط کشت مناسب است.

برای کشت بافت ابتدا باید ریزنمونه تهیه گردد و به محیط کشت منتقل شود. ریز نمونه می‌تواند از قسمت‌های مختلف گیاه تهیه شود مانند برگ، ساقه، ریشه، دمبرگ، گلبرگ و...

---

۱ totipotency۱

اهداف کشت بافت

کشت بافت با اهداف مختلفی انجام می‌شود که در زیر به چند نمونه اشاره می‌گردد:

۱. تکثیر گونه‌هایی که با روش‌های متداول قابل تکثیر نیستند یا به سختی تکثیر می‌شوند. همانطور که در زیست شناسی گیاهی خوانده اید در حالت عادی گیاهان به دو روش جنسی یا غیرجنسی تکثیر می‌شوند. در تکثیر جنسی با تولید بذر تکثیر صورت می‌گیرد و تکثیر غیر جنسی از طریق قلمه زدن، خوابانیدن و... انجام می‌شود. اما گیاهانی وجود دارند که بندرت و یا به سختی بذر می‌دهند و یا گیاهانی که از طریق غیر جنسی مانند قلمه زدن زیاد نمی‌شوند.

۲. تکثیر گونه‌های در معرض انقراض: به علت برداشت گیاهان برای اهدافی همچون استفاده از چوب، مصارف دارویی و چرای بی‌رویه دام‌ها (آن هم قبل از گل دادن و بذر دادن گیاهان) موجب می‌گردد، گیاهان در جنگل‌ها و مراتع فرصت رسیدن به مرحله گلدهی تولید بذر را نداشته باشند. در نتیجه بعد از چند سال جمعیت این گیاهان کم شده و به مرور زمان برخی از این گیاهان ممکن است در طبیعت دیده نشوند و اصطلاحا نسل آنها منقرض شود. یکی از کمک‌های زیست فناوری به جلوگیری از انقراض گیاهان استفاده از کشت بافت گیاهی است. بعنوان نمونه تکثیر گیاه و یا حتی تولید بذر مصنوعی از طریق

کشت بافت. بطور خلاصه بذر مصنوعی از طریق تولید جنین از یک ریز نمونه و بسته بندی جنین در یک پوشش پلیمری خاص همراه با مواد غذایی لازم بوجود می‌آیند. این بذرها در شرایط دمایی پایین تا زمان انتقال بـه طبیعـت نگهـداری می‌شوند.

۳. تکثیر گیاهان دارای آلودگی به منظور تولید گیـاه سـالم. یکـی از ایـن آلودگی ها، آلودگی ویروسی است اگر گیاهی دچار بیماری ویروسی شـود تمـام اندام‌های آن به ویروس آلوده اند حتی بذر تولید شده و یا قلمه هـا. امـا کشـت بافت در اینجا به کمک می‌آید. با تهیه ریز نمونه از بافت مریستم گیاه می‌توان گیاهان فاقد ویروس تولید نمود. زیرا سرعت رشد مریستم از سـرعت حرکـت و نفوذ ویروس سریع‌تر است و در بافت‌های مریستمی ویروس وجود ندارد.

۴. تکثیر با هدف تولید ترکیبات ارزشمند: یکی از ترکیبـات بـا ارزش در گیاهان متابولیت‌های ثانویه هستند. سلول‌های گیاهی به عنـوان تولیـد کننـده متابولیت‌های ثانویه شناخته می‌شوند. اما متابولیت ثانویـه چیسـت؟ عـلاوه بـر ترکیباتی مانند قندها و چربی ها، اسیدهـای آمینـه و پـروتئین‌هـا و اسـیدهـای نوکلئیک که بنام متابولیت‌های اولیه معروفند و در هر دوی سلول‌های گیاهی و جانوری وجود دارند. در گیاهان علاوه بر متابولیت‌های اولیه ترکیبات اختصاصی ساخته می‌شود که در سلول‌های جانوری نیست. ایـن ترکیبـات بنـام متابولیـت

ثانویه معروفند. برخلاف متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های ثانویه در حالت عادی برای ادامه حیات گیاه ضروری نیستند. بسیاری از این متابولیت‌های ثانویه دارای ارزش دارویی هستند مانند کافئین که به عنوان مسکن کاربرد دارد یا اسید سالیسیلیک که ماده اصلی قرص‌های آسپرین است. در این روش سلولهای تولید کننده متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت‌های مایع تکثیر می‌شوند و سپس متابولیت‌های ثانویه از سلول‌ها جدا و خالص می‌شوند.

کشت بافت گیاهی کاربردهای بسیار زیاد دیگری دارد که بعدا با آنها آشنا خواهید شد.

مراحل کشت بافت

بطور کلی مراحل کشت بافت عبارت است از:

۱. انتخاب و تهیه ریز نمونه مناسب (نوع ریز نمونه بسته به هدف از کشت بافت دارد)

ریز نمونه بخشی از گیاه است که از گیاه اصلی جدا می‌شود و برای کشت مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲. انتخاب و تهیه محیط کشت مناسب (نوع محیط کشت بسته به هدف از کشت بافت دارد).

محیط کشت شامل همه عناصری است که گیاه برای رشد نیاز دارد برای مثال ویتامین ها، هورمون ها، ساکاروز، عناصر معدنی کم مصرف و پر مصرف است.

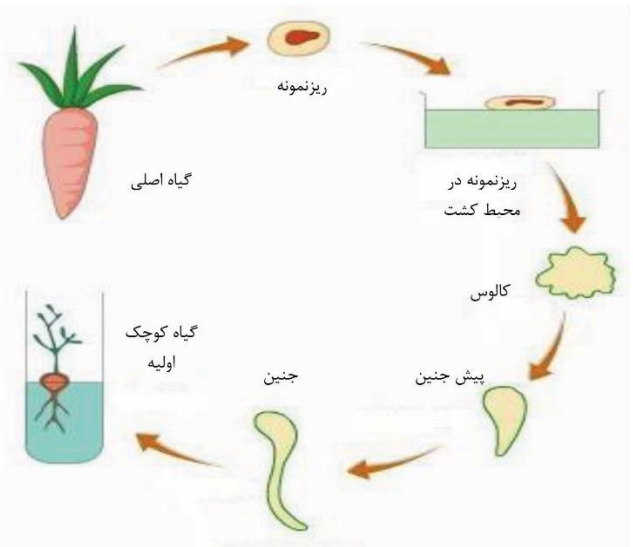
۳. استریل نمودن ریز نمونه و محیط کشت

۴. کشت ریز نمونه بر روی محیط کشت

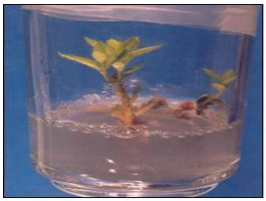
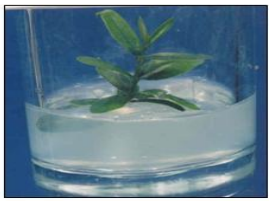
۵. نگهداری محیط‌های کشت حاوی ریزنمونه در شرایط دمایی و نوری مناسب

۶. انتقال گیاه کامل به گلدان و نگهداری در گلخانه به منظور سازگار شدن گیاه با محیط

۷. انتقال گیاه به مزرعه



شکل۵- مسیر کلی کشت بافت گیاهی

شکل۶- تصویر واقعی کشت بافت گیاهی- در این عکس جوانه‌ها در محیط کشت شروع به رشد کرده اند.

تمرین

۱. بنظر شما آیا ماست، نان، شیرینی و.. که کپک‌ها روی آنها رشد می‌کنند را می‌توان محیط کشت نامید؟ چرا؟

۲. همانطورکه در صفحات قبلی ذکر شد، کشت بافت گیاهی نیاز به مراحل مختلف دارد. آیا می‌توان این مراحل را کوتاه کرد؟

۳. آیا گیاهی که بطور معمول بذر تولید می‌کند، نیاز به کشت بافت گیاهی دارد؟

فعالیت عملی

آزمایش

تکثیر با تکنیک کشت بافت گیاهی

* با توجه به استفاده از مواد شیمیایی در تمام مراحل آزمایش حتما دستکش بپوشید.

قبل از شروع آزمایش لازم است شما کمی بیشتر با اجـزای محـیط کشـت آشنا شوید. نیازهای غذایی اولیه سلولهای گیاهی با گیاه کامل شـباهت زیـادی دارد. عناصر غذایی برای رشد و نمو گیاه ضروری اسـت و بـدون آب و عناصـر غذایی معدنی، گیاه قادر به ادامه حیات نیست. به طور کلی، محیط کشت بافـت گیاهی از مواد زیر تشکیل شده است :

عناصر پرمصرف یا ماکرو المان ها[1] (N, P, K, Ca, Mg, S)

عناصر کم مصرف یا میکرو المان ها[2] (Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo)

- ویتامین ها
- قندها (ساکارز، گلوکز، فروکتوز)
- هورمون‌ها یا تنظیم کننده‌های رشد
- اسیدهای آمینه و دیگر مواد نیتروژن‌دار (نیتروژن به صورت نیتراتی یا امونیاکی در عناصر پرمصرف)
- مواد جامدکننده محیط کشت مانند آگار

۱Macro Elements

۲ Micro Elements

کشت بافت گیاهی

مواد و وسایل جهت ۱ لیتر محیط کشت

	مواد و وسایل	تعداد
دستگاه ها	ترازوی حساس	۱ عدد
	هود لامینار	۱ عدد
	اتوکلاو	۱ عدد
	ژرمیناتور (یا فضایی با قابلیت تنظیم دما و نور)	۱ عدد
	pH متر	۱ عدد
	استوانه مدرج ۱۰۰ میلی لیتری	۱ عدد
	استوانه مدرج ۵۰۰ میلی لیتری	۱ عدد
	هیتر استیرر	۱ عدد
	سمپلر ۰/۵ تا ۱۰ میکرو لیتری	۱عدد
	سمپلر ۱۰ تا ۱۰۰ میکرو لیتر	۱عدد
	چراغ الکلی	۱ عدد
	پنس	۱عدد
	اسکالپل	۱عدد
	عینک ایمنی	۱ عدد
مواد مصرفی	پنبه	۱ بسته
	همزن مغناطیسی و مگنت	۱ عدد
	کاغذ صافی	۱۰ عدد
	قیف	۱ عدد
	ارلن ۱۰۰۰	۱ عدد
	بشر ۱۰۰۰	۱ عدد
	دستکش لاتکس	۱ بسته
	دستکش پلاستیکی	۱۰ بسته
	کبریت	۱ بسته
	پودر محیط کشت MS (آماده جهت یک لیتر محیط)	۱ بسته
	آگار	۸ گرم
	سر سمپلر کریستالی (استریل)	۱۰۰ عدد
	سر سمپلر زرد (استریل)	۱۰۰ عدد
	HCl	۵ میلی لیتر
	KOH یا NaOH	۵ میلی لیتر

ظرف شیشه‌ای درب‌دار (شیشه مربا)	۲۰ عدد
هورمون رشد NAA	۰/۰۱ گرم
هورمون رشدBAP	۰/۰۱ گرم
هورمون رشد IAA	۰/۰۱ گرم
آب مقطر	۲ لیتر
فالکون ۱۵ میلی لیتری	۳ عدد
اتانول ۷۰٪	۱۰۰میلی لیتر
آب ژاول	۱۰۰میلی لیتر
پتریدیش استریل	۳ عدد
پارافیلم	۲۰ سانتیمتر
گلدان	۲۰ عدد
خاک برگ	۱ بسته
پلاستیک متری	۱۰ متر
فیلتر سر سرنگی(۰/۴۵)	۶ عدد

مراحل تهیه یک لیتر محیط کشت پایه (MS)[1] با استفاده از پودرهای آماده

۱. حدود ۹۰٪ از حجم نهایی آب مورد نیاز برای تهیه محیط کشت را اندازه گیری نمائید. بعنوان مثال ۹۰۰ میلی لیتر برای حجم نهایی ۱۰۰۰ میلی لیتر. ظرفی که اندازه آن دو برابر حجم نهایی مورد نیاز باشد انتخاب کنید.

۱ موراشیگ و اسکوگ

۲. در حالی که آب با همزن مغناطیسی هم زده می شود، پودر آماده محیط کشت را اضافه کنید و تا زمانی که پودر کاملاً حل شود همزدن را ادامه دهید. ممکن است مقداری گرمادهی نیز نیاز باشد تا پودر کاملا حل شود.

۳. ظرف اصلی که محیط پودری در آن بوده را با مقدار کمی آب مقطر آبکشی نموده تا بقایای پودر جدا شده و آن را به محلول اضافه نمائید.

۴. ترکیبات پایدار در برابر گرما[۱] که قرار است اضافه شوند را در این مرحله اضافه نمائید (مثل ساکارز، ویتامین ها، برخی تنظیم کننده های رشد و غیره).

۵. حجم محیط کشت را با اضافه نمودن آب کافی به حجم نهایی مورد نظر برسانید.

۶. در حالی که محلول را هم می زنید، pH آن را با استفاده از NaOH, HCl یا KOH با دستگاه pH متر تنظیم نمائید. (PH=۵/۸)

- مقدار آگار مورد نیاز (۸ گرم برای ۱۰۰۰ میلی لیتر) را توزین نموده و محلول را تا زمانی که شفاف شود حرارت دهید.

۱ چون محیط کشت قبل از استفاده باید در اتوکلاو تحت دما و فشار بالا استریل گردد، در این مرحله فقط مواد مقاوم به حرارت اضافه می‌شود و نباید مواد حساس به دما مانند برخی از انواع هورمون ها را اضافه کرد زیرا حرارت باعث آسیب دیدن آنها می‌شود. برای استریل کردن ترکیبات حساس به دما انها را از فیلترهای مخصوص عبور می‌دهند و پس از اتوکلاو شدن محیط کشت به آن اضافه می‌کنند.

شکل ۷- توزیع محیط کشت در ظروف کشت

۷. محیط کشت را در اتوکلاو در ۲۰ دقیقه دمای ۱۲۱ درجه قرارداده تا استریل گردد. گاهی اوقات محیط کشت در ظروف کشت توزیع و سپس اتوکلاو می‌گردد. با توجه به اینکه دما و فشار در دستگاه اتوکلاو بالاست، این مرحله باید توسط کارشناس دستگاه یا مربی صورت گیرد.

۸. پس از اتمام استریل کردن، محیط کشت‌ها را از دستگاه اتوکلاو به محیط تمیزی منتقل نمائید تا سرد شود.

۹. در این مرحله باید به محیط کشت‌ها هورمون اضافه گردد.

ابتدا طبق پیوست ۱ کتاب حاضر از هورمون‌های مد نظر استوک (محلول ذخیره با غلظت بالا) تهیه گردد. سپس به ازای هر لیتر محیط کشت:

از محلول ذخیره هورمون NAA: ۲ میلی لیتر (حاوی ۲ میلی گرم) و از محلول ذخیره هورمون BAP ۱/۵ میلی لیتر (حاوی ۱/۵ میلی گرم) به محیط کشت اضافه گردد.جهت اطمینان از استریل بودن هورمون آنرا با فیلتر سر

سرنگی به محیط اضافه می‌کنیم. به منظور آشنایی بـا هورمـون‌هـای گیـاهی و نحوه به پیوست ۱ مراجعه کنید.

۱۰. محیط کشـت قبـل از سـفت شـدن در ظـروف کشـت توزیـع گـردد. محیط‌های کشت استریل تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردد. بهتر است این محیط‌ها ظرف مدت یکماه مورد استفاده قرار گیرند

شکل ۸- اتوکلاو کردن محیط کشت

باززایی[۱] مستقیم گیاه از طریق جوانه‌های نابجا

شما می‌توانید از این روش برای کشت بافت گیاهان مختلـف ماننـد بنفشـه آفریقایی استفاده کنید.

الف) استقرار کشت درون شیشه ای

۱ باززایی به معنای توانایی ایجاد یک گیاه کامل تحت شرایط کشت مناسب از یک ریزنمونه است.

۱. چند برگ سالم گیاه را انتخاب و از گیاه مادری جدا نمایید.

۲. برگها را به آرامی در آب ولرم حاوی چند قطره ماده شوینده شسته و به کمک آب شهری آبکشی نمایید.

۳. با استفاده از پنس، هر برگ را به آرامی داخل اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه غوطه‌ور نمایید و سپس با آب مقطر سترون آبکشی نمایید. بهتر است اینکار را درزیر هود لامینار[۱] انجام دهید.

۴. داخل استوانه مدرج ۶۰ میلی لیتر سفید کننده بریزید بعد یک قطره مایع ظرفشویی به آن اضافه کنید و سپس در زیر هود با آب مقطر استریل حجم آن را به ۲۵۰ میلی لیتر برسانید این مایع را داخل شیشه محتوی برگ‌ها بریزید به مدت ۲۰ دقیقه قرار دهید. هر ۵ دقیقه شیشه را تکان دهید. سپس در چهار نوبت پیاپی با آب مقطر سترون[۲] آبکشی نمایید.

۵. برای تهیه ریز نمونه، برگ‌ها را در یک پتری استریل قرار داده و با کمک پنس و اسکالپل استریل برگ را به قطعات ۱ سانتی متر مربعی تقسیم نمایید.

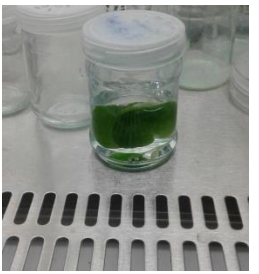
---

۱ هود لامینار دستگاهی است که جریان هوای استریل تولید می‌کند و در درون این دستگاه هیچ گونه آلودگی وجود ندارد. برای اطلاعات بیشتر به پیوست ۲ انتهای کتاب مراجعه کنید.

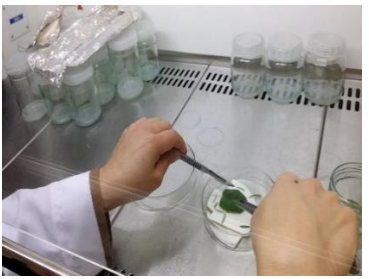
۲ آب مقطر سترون آبی است که در اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه قرارگرفته و استریل شده است.

گیاه کامل بنفشه آفریقایی

برگ



استریل کردن برگ



تهیه ریز نمونه از برگ

شکل۹ – از گیاه کامل تا تهیه ریزنمونه

۶. قطعات برگ را روی محیط کشت MS که قبلا تهیه و در شیشه‌ها ریخته اید و اکنون سفت شده است، قرار دهید.

۷. درب ظرف کشت را گذاشته و با پارافیلم[1] مسدود نمایید و آن‌ها را در اتاق رشد به مدت ۴ هفته قرار دهید (شرایط اتاقک رشد، دمای ۲۵°c با ۱۶ ساعت روشنایی /۸ ساعت تاریکی و شدت نوری معادل ۱۵ وات بر متر مربع مناسب می باشد.[2])

شکل۱۰- الف قرار دادن ریزنمونه بر روی محیط کشت

شکل ۱۰- ب قراردادن ظرف حاوی ریزنمونه کشت داده شده در اتاق کشت

۱ پارافیلم، پلیمری نفتی است و ظاهری شبیه چسب نواری دارد و ووقتی آنرا می‌کشید مانند کش، کش می‌آید و می‌تواند منافذ کوچک را مسدود کند.

۲ معمولا نور مناسب در مزرعه ۳۰ تا ۷۰ وات بر مترمربع است اما این شدت نور در کشت بافت مضر است (یک علت این مضر بود ایجاد اثر گلخانه‌ای در ظروف کشت و نتیجتا بالا رفتن بیش از حد دما است) نتیجتا در شرایط کشت بافت شدت نور ۸ تا۱۵ وات بر متر مربع برحسب گیاه استفاده می‌شود.

ب) مرحله تکثیر (پرآوری شاخه):

۱. پس از ایجاد جوانه های نابجا[۱] روی ریزنمونه ها، ظروفی را که عاری از آلودگی هستند، انتخاب نمایید.

شکل ۱۱- جوانه نابجا تشکیل شده بر روی ریز نمونه برگ

با کمک پنس و اسکالپل استریل و در زیر هود لامینار توده گیاهچه های تولید شده را به قطعات کوچک‌تر تقسیم نمایید و به محیط کشت تازه منتقل نمایید.

شکل ۱۲- تفکیک گیاهچه ها

۱ جوانه نابجا جوانه‌ای است که در محلی غیر از گرههای ساقه ایجاد شود.

۲. درب ظروف کشت را گذاشته و با پارافیلم مسدود نموده و بـه مـدت ۴ هفته در اتاق رشد (همان شرایط قبلی) قرار دهید.

ج) مرحله ریشه زایی

۱. ساقه های با طول حداقل ۱ سانتی متری را در زیر هـود لامینـار جـدا نموده و جهت القاء ریشه زایی به محیط کشت جدید که حاوی یک میلی گرم در لیتر هورمون IAA[1] است، منتقل نمایید. (یعنی از محلول ذخیره تهیه شـده طبق پیوست ۱ مقدار ۱ میلی لیتر برداشته به یـک لیتـر محـیط کشـت جدیـد اضافه گردد)

۲. درب ظروف کشت را گذاشته و با پارافیلم مسدود نموده و بـه مـدت ۴ هفته در اتاق رشد (همان شرایط قبلی) قرار دهید.

شکل ۱۳- القا ریشه زایی

۱ نوعی هورمون اکسین طبیعی

د) مرحله انتقال گیاهچه های ریشه‌دار شده به محیط برون شیشه ای

هدف از مراحل زیر مقاوم سازی و سازگار نمودن گیاهان حاصل با شـرایط غیر استریل و محیط طبیعی است.

۱. گیاهچه های ریشه‌دار شده را به دقت از ظروف کشت خارج نمایید و با آرامی داخل آب ولرم شستشو دهید تا آگار چسبیده به آن‌ها جدا شود.

شکل ۱۴- گیاهچه ریشه دار

۲. گیاهچه‌ها را در داخل گلدان های کوچک حاوی مخلوط خاکی سترون (پرلیت[۱] و پیت ماس[۱]) کشت نمایید. این خاک بایستی نمناک باشد ولی خیس و اشباع از آب نباشد.

۱ پرلیت در واقع خاک نیست بلکه از سنگ معدنی درست شده است و قابلیت نگهداری آب آن بالاست

۳. گلدان حاوی گیاه را در یک پلاستیک شفاف پیچیده بـه طـوری کـه، پلاستیک به صورت خیمه مانند اطراف گلدان و گیاه قرار گیرد. در هفته اول نیاز به آبیاری ندارند.

۴. گلدان را در قفسه های اتاق رشد و در معرض نور قرار دهید. محفظـه پلاستیکی را چند دقیقه ای به طور روزانه جهت انجام تهویه بـاز کنیـد. پـس از یک هفته اجازه دهید که پلاستیک به مدت ۱ ساعت باز باشد. در هفته های بعد تهویه را به مدت بیش از ۳ ساعت افزایش دهید. اکنون شما یـک گیـاه کامـل دارید.

۵. در پایان هفته سوم، پلاستیک را کاملاً حذف نماییـد تـا گیاهچـه بـه محیط اطراف خود سازگار شوند.

اطلاعات ضروری:

۱ پیت ماس در واقع خاک نیست بلکه منشا آلی دارد(بقایای خزه) و قدرت نگهداری آب بالایی دارد.

چنانچه در بخش‌های قبلی مشاهده نمودید، در بسیاری از مراحل کشت بافت گیاهی نیاز است تا از مواد و یا وسایل استریل استفاده شود و یا در مراحلی از هود لامینار استفاده شود. ولی واقعا دلیل این کار چیست؟

همانطور که می‌دانیم در اطراف ما میکروب‌های زیادی زندگی می‌کنند و دستان شما هم اکنون حاوی میکروب‌های زیادی است. در کشت بافت گیاهی و در ابتدا، ما یک محیط کشت می‌سازیم که این محیط برای رشد بسیاری از میکروب‌ها و بویژه هاگ قارچ‌ها محیط بسیار مناسبی است. در صورتی که محیط استریل نشود، این هاگ‌ها براحتی روی محیط کشت رشد می‌کنند و ریز نمونه را از بین می‌برند. بنابراین لازم است تا محیط کشت استریل شود تا تمامی میکروب‌ها در اتوکلاو کشته شوند. حال محیطی که از اتوکلاو خارج می‌شود کاملا استریل است ولی اگر درب شیشه حاوی محیط کشت حتی برای چند ثانیه در محیط آزمایشگاه باز شود، میکروب‌ها به درون شیشه می‌روند و روی محیط کشت رشد می‌کنند. بنابراین شیشه محیط کشت تنها باید در محیطی باز شود که هوای آن فاقد میکروب است. هود لامینار چنین محیط استریلی را برای ما فراهم می‌کند. حال نوبت استریل کردن نمونه گیاه است، نمونه گیاهی را نمی‌توان با اتوکلاو استریل کرد زیرا اتوکلا همانطور که باعث از بین رفتن میکروب‌ها می‌شود می‌تواند سلولهای گیاهی را نیز از بین ببرد. نمونه برگ توسط مواد استریل کننده مانند وایتکس استریل می‌گردد. حال نمونه استریل

است ولی اگر برای برش نمونه از تیغ غیر استریل استفاده شود، میکروب‌ها به نمونه منتقل می‌شوند و روی محیط کشت رشد می‌کنند. بنابراین باید از تیغ و پنس استریل استفاده گردد. در تمام مراحل که درب شیشه حاوی نمونه باز می‌شود، این عمل حتما باید زیر هود لامینار انجام شود.

آلودگی محیط‌های کشت با قارچ یکی از مشکلات کشت بافت گیاهی است و در صورتی که موارد گفته شده فوق رعایت نشود، حتما محیط کشت آلوده می‌شود و نمونه گیاهی از بین می‌رود.

مبحث سوم
اخلاق و ایمنی در پژوهش

در هر علم و فناوری خصوصا فناوری‌های جدید و نو ظهور رعایت اصول ایمنی و اخلاق الزامی است، وگرنه آن فناوری نه تنها موجب پیشرفت و ارتقاء ما نخواهد شد بلکه ممکن است منجر به نابودی نسل بشر گردد. در مبحث حاضر بطور مختصر در خصوص اخلاق در پژوهش مطالبی خواهید خواند.

اخلاق در پژوهش

نقطه عطف تاریخ اخلاق در پژوهش، به مطالعات غیر اخلاقی تعدادی از پزشکان نازی طی جنگ جهانی دوم بر می‌گردد که منجر به آسیب جدی به سلامت اسرای اردوگاه‌ها شد. در این اردوگاه‌ها زندانیان را مجبور به قرار گرفتن در معرض سرمای شدی مانند قرار گرفتن در آب یخ برای ساعات طولانی به منظور بررسی اثر سرمازدگی، ریختن سم در غذای اسرا و کالبدشکافی آنها بعد از مرگ، عقیم کردن و.. کرده بودند. پس از جنگ در سال‌های ۱۹۴۷-۱۹۴۶، در دادگاهی در شهر نورنبرگ در کشور آلمان به این پرونده رسیدگی شد.

آن محاکمه منجر به وضع قوانینی برای پژوهش (خصوصا مطالعه بر روی انسان) گردید که به نام کدهای نورنبرگ معروفند. بطور کلی مفهوم کدهای نورنبرگ عبارت است از:

۱. شرکت افراد در پژوهش باید داوطلبانه باشد.

۲. شرکت کنندگان باید با رضایت کامل در پژوهش شرکت کنند.

۳. سود و منفعت حاصل از پژوهش باید بیشتر از مضرات آن باشد.

بعدها بیانه‌ای توسط انجمن جهانی پزشکی در شهر هلسینکی در کشور فنلاند برای مطالعه بر روی انسان تصویب شد که بنام بیانیه هلسینکی معروف است در آن بر ضرورت داوری طرح‌های پژوهشی و بررسی رعایت اصول اخلاق قبل از اجرای پژوهش تاکید شده است. در ایران کمیته‌ای بنام " کمیته اخلاق در پژوهش" این داوری را بر عهده دارد.

کسب رضایت از افراد یکی از مهمترین نکات پژوهش در انسان هاست. به عنوان مثال اگر محققی بخواهد چربی خون را بررسی کند باید از افراد اجازه بگیرد و نمی‌تواند با مراجعه به یک مرکز خون گیری چند نمونه خون تهیه کند. اما اگر محققی بخواهد با استفاده از نشانگرهای مولکولی احتمال ابتلا به یک بیماری ژنتیکی را در آینده در تعدادی از افراد بررسی کند نه تنها باید از خود فرد مورد مطالعه اجازه بگیرد بلکه چون اگر در فرد مورد مطالعه وجود ژن این

بیماری مشخص گردد احتمال وجود آن در بستگان او نیز مشخص می‌گردد، برای چنین آزمایشی باید از تمام خانواده او اجازه و رضایت آگاهانه کسب گردد.

احترام به حقوق حیوانات آزمایشگاهی:

شکل ۱۵- استفاده از موش در پژوهش ها

ما بسیاری از پیشرفت‌های علمی خود را مدیون مطالعات بر روی حیوانات آزمایشگاهی هستیم مانند آزمایش داروها قبل از ورود به بازار بر روی حیوانات و... اما لازم است در حین کار با حیوانات به حقوق آنها احترام گذاشت. بعنوان مثال :

- در کار با حیوانات آزمایشگاهی ما تا حد ممکن باید کمترین تعداد حیوان استفاده شود. البته تاحدی که به تحقیق آسیب نزد.
- حیوانات در شرایط مناسب نگهداری و حمل و نقل گردند.

- پس از هر نوع عمل جراحی از داروهای لازم جهت ممانعت از عفونـت و کاهش درد استفاده شود.

- پس از مرگ حیوانات باید آنها را در محل مناسب دفن نمود.

شکل ۱۶- نماد تشکر از حیوانات آزمایشگاهی بخاطر خدماتشان در جهت پیشرفت علم
که در نزدیکی موسسه سیتولوژی و ژنتیک نووسیبریسک در روسیه[۱] نصب شده است.

۱ Institute of Cytology and Genetics in Novosibirsk, Russia

ایمنی زیستی:

با توجه به اینکه شما در مسیر آموختن زیست فناوری فعالیت‌های عملی دارید و ممکن است برحسب نیاز وارد برخی آزمایشگاه‌های تخصصی در دانشگاه ها، مراکز تحقیقاتی و پژوهشگاه‌ها شوید، در این مبحث ابتدا شما را با انواع مختلف درجات ایمنی آشنا می‌کنیم.

شکل۱۷- نماد ایمنی زیستی

علامت فوق به معنای رعایت اصول ایمنی زیستی است. این علامت در آزمایشگاه‌هایی که با موجودات زنده و یا اجزائی از موجودات سر وکار دارند بکار می‌رود.

همانطور که بیاد دارید در کتاب زیست شناسی دبیرستان خوانده اید، زمانی محققین قصد داشتند از تلاقی دو گیاه کلم و هویج با کمک زیست فناوری گیاهی تولید کنند که ریشه آن هویج و ساقه آن کلم باشد تا بتوان از زمین‌های

کشاورزی بهره برداری بیشتری کرد. اما نتایج تحقیق آنها برعکس شد و گیاهی که تولید شد ساقه‌ای مانند هویج و ریشه‌ای مانند کلم داشت!!! و یا اتفاق دیگری که از تلاقی زنبور عسل با یک زنبور درشت هیکل‌تر زنبور عسل درشتی تولید کنند که بتواند عسل بیشتری تولید کند اما باز هم برعکس شد زنبور بزرگی تولید شد اما قابلیت تولید عسل را نداشت و برعکس قدرت تولید سم بسیار زیادی داشت!!!

از این اتفاقات در دنیای زیست فناوری بسیار رخ می‌دهد، بعبارتی در هر آزمایشی امکان پاسخ نگرفتن و به هدف نرسیدن هست اما محقق نباید دلسرد شود. همیشه با پشتکار هدف دست یافتنی است. اما در حوزه زیست فناوری چون احتمال چنین خطاهایی بالاست باید مواظب بود دستاوردهای این تحقیقات در شرایط ایمن نگهداری شوند تا قبل از تائید بی‌خطر بودن به محیط طبیعی وارد نگردند.

در مورد زنبور خطرناکی که در مثال بالا بدان اشاره شد متاسفانه عدم رعایت اصول ایمنی باعث فرار تنها چند عدد از آن زنبورهای بسیار خطرناک و ورودشان به طبیعت گردید. این زنبور در طبیعت تکثیر شد و سالانه جان صدها انسان را به خطر می‌اندازد.

حتی اگر این دستاوردها بی‌خطر باشند ورود آنها به طبیعت می‌تواند اکوسیستم را بهم بزند پس قبل از رها کردن هر موجودی در طبیعت باید به

دقت به جنبه هابی مختلف آن توجه کرد. یک مثال ساده و حتی غیر زیست فناوری همین لاک پشت‌های زیبا و کوچکی است که طی چند سال اخیر در عید نوروز فروخته می‌شوند. چون این لاک پشت گوشت خوار است و متعلق به این محیط نیست، با رها شدنش در طبیعت باعث گردیده نسل برخی موجودات زنده به خطر بیفتد.

هرچند این لاک پشت‌ها محصول زیست فناوری نیستند اما به اکوسیستم آسیب زده اند. پس برای حفظ محیط زیست باید دقت کرد به ویژه در خصوص دستاوردهای زیست فناوری.

هرچند تاکنون اثرات زیان آوری از محصولات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری از نقطه نظر علمی به اثبات نرسیده است، اما آثار احتمالی آن نیاز به بررسی مداوم دارند. از آنجا که در طول تاریخ اهداف سودجویانه و برتری طلبانه برخی انسان‌ها که به منظور نیل به اهداف تجاری و مقاصد اقتصادی خود، ابعاد ایمنی، معیارهای انسانی و منافع عمومی را نادیده می‌گیرند. احتمال سوء استفاده از زیست فناوری وجود دارد.

لذا لازم است قوانین و مقرراتی برای کار با این موجودات تراریخت که اصطلاحا GMO[1] نامیده می‌شوند وضع گردد. هر موجود تراریختی باید به

1. Genetically Modified Organism

درستی بررسی و از نظر ریسک خطر ارزیابی گردند تا پس از تائید ایمنی و سلامت وارد محیط زیست و سبد دارویی یا غذایی ما گردد.

به منظور اطمینان از محصولات تولید شده و جلوگیری از سوء استفاده‌های احتمالی، پروتکلی برای رعایت اخلاق در پژوهش‌های زیست فناوری نیز تدوین گردیده که تحت نام "پروتکل کارتاهنا" معروف است. در ایران کمیته ملی ایمنی زیستی از سال ۱۳۷۹ شکل گرفته است.

اصول ایمنی در آزمایشگاه

به علت اهمیت اخلاق و ایمنی پژوهش‌های زیست فناوری، در این مبحث به معرفی قوانین و مقرارت کار در آزمایشگاه‌های زیست فناوری می‌پردازیم.

آزمایشات زیست فناوری باید در شرایط ایمنی خاصی در آزمایشگاه انجام گردد. در تقسیم بندی آزمایشگاه‌ها آنها را برحسب شدت و سختی قوانین و مقررارت ایمنی کار بعبارتی خطرات موجود در آنها به ۴ دسته تقسیم می‌کنند که اصطلاحا ۴ سطح ایمنی زیستی است. کم خطرترین و ساده‌ترین قوانین متعلق به آزمایشگاه‌های سطح ۱ است و خطرناکترین و سختگیرانه‌ترین قوانین متعلق به آزمایشگاه‌های سطح ۴ است. در زیر بطور مختصر شما با ۴ سطح ایمنی مذکور آشنا می‌شوید:

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح۱:

- این مقرارت ایمنی زیستی برای کار با عواملی است که حداقل میـزان خطر برای افراد و محیط را دارند، می‌باشد. از جمله این آزمایشگاه می‌تـوان بـه آزمایشگاه‌های مدارس اشاره کرد .

- عبور و مرور در این آزمایشگاه‌ها محدود نیست.

- آزمایشات بر روی میزهای معمولی آزمایشگاه انجام می‌شود.

- معمولا نیازی به استفاده از دستگاه‌های خاص ماننـد هـود بیولوژیـک نیست.

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح ۲:

- مقرارت این آزمایشگاه مانند سطح ۱ است اما آزمایشـاتی کـه در ایـن آزمایشگاه‌ها کار می‌شـود کمـی خطرنـاکتر از سـطح ۱ هسـتند. از جملـه ایـن آزمایشگاه می‌توان به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمولی اشاره کرد .

- حضور در این آزمایشگاه فقط در زمان انجام کار مجـاز اسـت و تـردد بی‌مورد ممنوع است.

- بعلت ایجاد آئروسل‌های آلوده در محیط، آزمایشات حتما بایـد در زیـر هود بیولوژیک انجام شود.

تعریف آئروسل: به ذرات جامد یا مایع پراکنده شده در هـوا آئروسـل گوینـد. این ذرات ممکن است حاوی آلودگی‌های شیمیایی یا میکروب باشند.

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح ۳:

- مقرارت این آزمایشگاه‌ها سختگیرانه‌تر از دو سطح قبلی است زیرا عوامل بیماریزای خطرناکی که ممکن است مرگبار باشند در این آزمایشگاه‌ها وجود دارند.
- علاوه بر مقرارت آزمایشگاه‌های سطح ۱ و۲، مقرارت زیر نیز رعایت می‌گردد.
- کارکنان جهت کار با عوامل بیماریزا و خطرناک آموزش می‌بینند.
- علاوه بر اینکه تمام آزمایشات زیر هود بیولوژیک انجام می‌شود، افراد باید پوشش حفاظتی خاص داشته باشند.
- آزمایشگاه دارای فضای با طراحی خاص است.

مقرارت ایمنی زیستی کار در آزمایشگاه‌های سطح ۴:

- این نوع مقررات سختگیرانه‌ترین مقررات است زیرا در آزمایشگاه‌های سطح ۴ با عوامل مرگباری مانند تب کنگو، آنفلونزا A و .. کار می‌شود.
- در این آزمایشگاه‌ها علاوه بر رعایت مقرارت ۳ سطح قبلی موارد زیر نیز رعایت می‌گردد.
- افراد با لباس‌های مخصوص حق ورود دارند.
- فضای کل آزمایشگاه مانند یک هود بیولوژیک تهویه می‌شود.

- افراد قبل از خروج از آزمایشگاه باید بـا مـواد شـیمیایی خاصـی دوش بگیرند تا آلودگی را از آزمایشگاه خارج نکنند.

شکل۱۸- عکس واقعی از یک آزمایشگاه سطح ۴

دفع پسماند

در تمام آزمایشگاه‌ها چه زیست فناوری و چه غیر زیست فناوری نمی‌توان به راحتی زباله‌های خانگی پسماندها را دور ریخت مثلا ریختن یک محـیط کشـت درون سینک کار بسیار خطرناکی است. باید تمام پسـماندها قبـل از دور ریختـه شدن، غیرفعال شوند و سپس به بسته به نوع پسماند بطور مناسب دفـع گردنـد. بعنوان مثال یک محیط کشت حـاوی بـاکتری بایـد قبـل از دور ریختـه شـدن اتوکلاو گردد تا باکتری‌های کشته شوند. این روش در مورد پسماندهای زیستی و خصوصا دستاوردهای زیست فناوری (ارگانیسم‌های حـاوی DNA نوترکیـب) باید به شدت رعایت شود.

پیوست ها
معرفی ابزارها و دستگاه ها

پیوست ۱

روش تهیه محلول استوک (ذخیره) از هورمون ها:

برای اضافه کردن هورمون به محیط کشت ابتدا باید محلول ذخیره (استوک) آنها را تهیه کنیم

محلول ذخیره اکثر هورمون‌ها به گونه‌ای تهیه می‌شوند که در ۱ میلی لیتر از محلول۱ میلی گرم از ماده موردنظر وجود داشته باشد(۱ mg/ml).

برای تهیه چنین محلولی ۱۰ میلی گرم (۰/۰۱گرم) از ماده شیمیایی (پودر خالص هورمون) به دقت وزن گردیده و در حلال خاصی (مثل دو یا سه قطره NaOH) حل می‌گردد. سپس با افزودن آب مقطر حجم نهایی به ۱۰ میلی لیتر می‌رسد. بعنوان مثال

– اگر بخواهیم به محیط کشت ۲ میلی گرم NAA (به ازای هر لیتر محیط کشت) اضافه نماییم، کافی است از محلول ذخیره (استوک) تهیه شده به روش بالا به اندازه ۲ میلی لیتر برداشته شود.

– اگر بخواهیم ۱/۵ میلی گرم BAP (به ازای هر لیتر محیط کشت) اضافه نماییم، کافی است از محلول ذخیره (استوک) تهیه شده به روش بالا به اندازه ۱/۵ میلی لیتر برداشته شود.

– اگر بخواهیم۱ میلی گرم IAA(به ازای هر لیتر محیط کشت) اضافه نماییم، کافی است از محلول ذخیره (استوک) تهیه شده به روش بالا به اندازه ۱میلی لیتر برداشته شود.

باتوجه به اینکه اکثر هورمون‌های مورد استفاده حساس به گرما هستند، افزودن هورمون‌ها بعد از مرحله اتوکلاو کردن صورت می‌گیرد و جهت جلوگیری از انتقال آلودگی توسط هورمون‌ها آنها را با استفاده از روش ضدعفونی فیلتری (فیلتر ۰/۲۲ میکرون) در زیر هود استریل شده و زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۵۰ درجه سانتیگراد رسید، به آن اضافه شده و پس از به هم زدن، محیط در ظروف کشت توزیع می شود.

آشنایی با برخی هورمون‌های گیاهی

همه موجودات زنده در حالت طبیعی به هورمون‌ها نیاز دارند. در گیاهان این که در چه زمانی گیاه رشد کند، بلند شود، ریشه بزند و... توسط هور مون‌ها کنترل می‌شود. در آزمایشگاه‌های کشت بافت نیز از هورمون‌ها برای القا ساقه زایی، ریشه زایی و... استفاده می‌شود. امروزه علاوه برانواع هورمون‌های طبیعی که از گیاهان بدست می‌آید و بسیار گران قیمت است، برای کاهش هزینه

هورمون انواع مصنوعی آنرا نیز ساخته اند. برخی از پرکاربردترین هورمون‌ها در آزمایشگاه عبارتند از:

اکسین:

هورمون‌های اکسین نقش‌های متفاوتی در رشد دارند مانند: طویل شدن سلول، تقسیم سلولی، تشکیل کالوس و تشکیل ریشه نابجا. NAA یک نوع هورمون مصنوعی از گروه اکسین‌ها است.

سیتوکنین:

هورمون‌های سیتوکنین باعث تقسیم سلولی، تورم بافت، تحریک جوانه‌ها می‌گردد.BAP یک نوع هورمون مصنوعی از گروه سیتوکینین است.

در واقع در یک کشت بافت نسبت ترکیبی این هورمون‌ها به القا مراحل مختلف رشد و نمو کمک می‌کند.

اگر به آزمایش کشت بافت در متن کتاب مراجعه کنید مشاهده خواهید کرد که سه مرحله کلی کاربرد هورمون‌ها در کشت بافت بصورت زیر است:

مرحله اول: مرحله استقرار و جوانه زنی است که نیاز به هورمون ندارد.

مرحله دوم: مرحله تکثیر است که در این مرحله مقدار مورد نیاز اکسین کم اما مقدارسیتوکنین زیاد است.

مرحله سوم: مرحله ریشه دهی است که باید مقدار اکسین زیاد اما مقدار سیتوکنین کم باشد.

پیوست ۲
ابزارها و دستگاه ها

اسکالپل

اسکالپل یا پیستوری نوعی تیغ جراحی است. اسکالپل‌ها ممکن است یک بار مصرف یا با کاربرد همیشگی باشند. تیغه برخی از آن‌ها را می‌توان تعویض کرد ولی برخی دیگر قابلیت تعویض ندارند ولی می‌توان آنها را تیز کرد.

شکل۱۹ - اسکالپل

پنس

پنس وسیله‌ی است که به محقق اجازه می‌دهد وسایل و ذرات کوچک را محکم نگهدارد یا جابجا کند.

شکل ۲۰- پنس

سمپلر

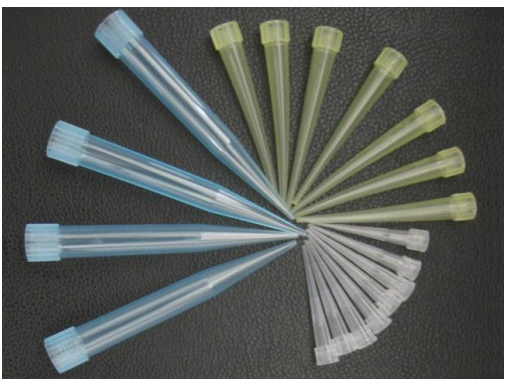
برای برداشتن مایعات از پیپت استفاده می‌شود اما برای مایعات کم حجـم از میکروپیپت استفاده می‌گردد. سمپلر یک نوع میکروپیپت است.

شکل ۲۱- سمپلر

- بر روی بدنه هر سمپلر محدوده مجاز (حداقل و حـداکثر حجـم مجـاز قابل برداشت) نوشته شده است. دقت کنید از هر نـوع سـمپلر خـارج از محـدوده مجاز آن استفاده نکنید.

قبل از معرفی انواع سمپلر بر اساس محدوده مجاز استفاده، بهتر است بدانید یک میکرولیتر یک میلیونم (۰/۰۰۰۰۰۱) لیتر است بعبارتی یک هزارم میلی لیتر. سمپلرها معمولا شامل انواع زیر هستند:

- کمتر از ۱۰ میکرولیتر
- بین ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر
- بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرو لیتر
- انواع مختلفی از سرسمپلر(تیپ) وجود دارد. برای هر سمپلر از سر سمپلر مناسب استفاده کنید.



شکل۲۲- سرسمپلر

هر یک از این سر سمپلرها برای یک نوع سمپلر بکار می‌رود، مثلا

- معمولا سر سمپلر آبی رنگ برای سمپلر ۱۰۰ تا۱۰۰۰ میکرولیتری
- معمولا سر سمپلر زرد رنگ برای سمپلر ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتری
- معمولا سر سمپلر کریستالی رنگ برای سمپلر کمتر از ۱۰ میکرولیتری

میکرو تیوپ یا ویال

میکرو تیوپ‌ها لوله‌های آزمایش درب‌دار کوچکی برای نگهداری و آزمایشات بر روی حجم کم محلول استفاده می‌شود.

شکل ۲۳- میکرو تیوپ

ورتکس و اسپین

ورتکس دستگاه کوچکی است که گاه بصورت مجزا (شکل۲۴) و گاه با دستگاه اسپین بصورت یک دستگاه مرکب (شکل۲۵) است.

شکل۲۴- ورتکس

شکل۲۵- ورتکس_اسپین

کاربرد ورتکس مخلوط کردن بافرهاست. اما برای محلول‌های حاوی قطعات DNAی بزرگ مناسب نیست چون ممکن است DNA شکسته شود.

اسپین باعث می‌گردد قطرات پراکنده شده بر روی بدنه میکروتیوپ یکجا در کف میکروتیوپ جمع گردد. معمولا پس از اتمام تهیه محلول و یا بعد از ورتکس حتما باید اسپین کرد.

هود

دو نوع اصلی عبارتند از

۱. هود شیمیایی: برای کار کردن با مواد شیمیایی بکار می‌روند. هدف اصلی استفاده از این هودهای حفاظت کاربر (محقق) از استنشاق مواد شیمیایی است.

۲. هودهای زیستی : این نوع هود که با نام هود لامینار معروفند برای کار با موجودات زنده (کشت سلول، بافت گیاهی و میکروب) بکار می‌روند در این نوع هود هدف اصلی از استفاده، برعکس هود شیمیایی حفاظت از نمونه مورد آزمایش است. بعبارتی جلوگیری از ورود آلودگی به محیط کشت است. البته گاه هدف هود لامینار دوجانبه است یعنی حفاظت از کاربر و نمونه بطور همزمان. هودهای لامینار براساس سطح ایمنی مد نظر خود انواع مختلفی دارند.

الف) هود شیمیایی

ب) هود لامینار

شکل ۲۶- هود

همزن مغناطیسی

همزن مغناطیسی وسیله‌ای است جهت حل کردن مواد با هم که با قرار دادن یک آهنربا در محلول و ایجاد میدان مغناطیس توسط دستگاه عمل همزدن انجام می‌گردد. برخی همزن‌های مغناطیسی قادر به ایجاد حرارت نیز هستند.

شکل۲۷- همزن مغناطیس

اتوکلاو

اتوکلاو دستگاهی است که با استفاده از بخار آب تحت فشار، عمل استریلیزسیون را انجام می‌دهد.

اتوکلاو ایستاده

اتوکلاو رو میزی

شکل۲۸- اتوکلاو

بن ماری

بن ماری یا حمام آب گرم یک دستگاه با محفظه آب است که قابلیت گرم کردن آب در آن وجود دارد و زمانی که نیاز به حرارت دادن مواد بصورت غیرمستقیم داریم از آن استفاده می‌شود.

شکل ۲۹- بن ماری

pH متر:

pH متر دستگاه الکترونیکی برای محاسبه pH یا بعبارتی اندازه گیری میزان اسیدی یا بازی (قلیایی) بودن مواد استفاده می‌گردد. این دستگاه متشکل از دو بخش اصلی یعنی میله کاوشگر و اندازه‌گیر است. میله کاوشگر pH محلول را تبدیل به سیگنال الکتریکی کرده و اندازه‌گیر آن را تحلیل و میزان pH را نمایش می‌دهد.

شکل ۳۰- pH متر

منابع

- صنعتی محمد حسین و گروهی از مترجمین. پروتکل ایمنی زیستی کارتاهنا. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی. ۱۳۸۰

- عبدالکریم زاده محمدرضا. آموزش کشت بافت گیاهی در منزل. انتشارات مرسل. ۱۳۸۴.

- فرامرزی محمدعلی، نفیسی ورچه نسترن، مرادپور زهرا و شریف راده محمد. ایمنی زیستی در آزمایشگاه. انتشارات نویسه. ۱۳۸۶.

- کمال الدینی حسین، سلوکی محمود، ریگی نژاد نفیسه و حدادی فاطمه. بیوتکنولوژی گیاهی– مبانی روش‌های آزمایشگاهی. انتشارات گلبن. ۱۳۸۵.

- نوری دلویی محمدرضا، خسروی نیا سامیه، سامانی امیرعباس و مجیدفر فرزان. آموزش بیوتکنولوژی در مدارس– سند ۳۹ یونیسکو. انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی. پائیز ۱۳۷۳.

- Masoumeh Ahmadi koochaksarai, Seyed Kamal Kazemitabar, Nargess Abdali, "Investigation and selection of optimisation medium culture to regeneratin of Satureja hortensis L. by explants of Leave and Shoot" 7th national biotechnology congress of I.R. Iran. 12-14Sep. 2011 Tehran Iran