

	مرکز منطقه ای کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران (PTCC)	کد: QA/G/751/03/03
	راهنمای نگهداری میکروارگانیسم در فریزر برای متقاضی	صفحه کنترل

تعاریف:

محلول تهیه سوسپانسیون: محلول پایه برای تهیه سوسپانسیون میکروبی با فشار اسمزی تقریباً همسان با فشار اسمزی سلول محلول نگهدارنده: محلول حاوی مواد نگهدارنده برای جلوگیری از ایجاد کریستال یخ و آسیب رساندن به سلول هنگام فریز کردن سلول ها مثل گلیسرول ویال کرایو: ظروف پروپیلن درپيچدار به حجم ۲ میلی لیتر مخصوص نگهداری سوسپانسیون سلولی در دمای پایین (منجمد)

وسایل و مواد مورد نیاز :

- ۱- کشت تازه میکروارگانیسم
- ۲- پیپت پاستور استریل
- ۳- ویال کرایوتیوب ۲ ml استریل یا میکروتیوب ۱.۵ ml استریل یا لوله های استریل 6.5-7.5 x 100 mm
- ۴- پنس، پنبه ، فویل (استریل)
- ۵- محیط کشت مناسب برای رشد میکروارگانیسم ها^۱
- ۶- Suspending medium: محیط استریل Nutrient broth یا شیر بدون چربی ۱۵٪ یا محیط مایع اختصاصی سویه حاوی ۱۵-۱۰٪ گلیسرول
- ۷- فریزر با دمای بالای ۸۰- و تانک ازل

روش کار:

- ۱- تهیه سوسپانسیون سلولی :

کشت مایع : کشت را درون ظروف سانتریفیوژ استریل منتقل کنید و بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ تا ۵۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ کنید یادآوری ۱: برخی سویه ها برای رسوب نیاز به دورهای بالای سانتریفیوژ دارند (۸-۱۰ هزار دور در دقیقه)

مایع رویی را با دقت خارج نمایید تا تنها رسوب سلولی درون ظرف باقی بماند.

کشت جامد: در صورتیکه انتهای لوله کشت، مایع جمع شده باشد با پیپت پاستور استریل قبل از تهیه سوسپانسیون آن را خارج نمایید
- ۱-۱ برای تهیه سوسپانسیون با استفاده از پیپت پاستور استریل در شرایط استریل میزان مناسب Suspending medium برداشت نمایید
- ۲-۱ محیط مایع مربوط به تهیه سوسپانسیون را روی سلول ها ریخته و با استفاده از پیپت پاستور پیپتاژ کنید بطوریکه یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت تهیه نمایید.
- ۲- اضافه کردن نگهدارنده: به میزان هم حجم سوسپانسیون سلول ، گلیسرول ۳۰٪ اضافه نمایید تا میزان مطلوب گلیسرول در سوسپانسیون حاصل شود.(غلظت مورد نیاز گلیسرول در سوسپانسیون فریزری حدود ۱۰ تا ۱۵٪ می باشد)
- ۳- سوسپانسیون حاصل را درون لوله های آمپول یا ویال های کرایو یا میکروتیوب های استریل بطور استریل و یکنواخت پخش نمایید بطوریکه در هر آمپول حدود ۴۰۰ تا ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون وارد شود
- ۴- درپوش گذاری: در صورتیکه از لوله های آمپول استفاده کرده اید با استفاده از پنس استریل سر لوله هارایک عدد پنبه استریل قرار دهید و روی آنرا با فویل استریل بپوشانید و آنرا با چسب نوار محکم نمایید. در صورتیکه درون ویال های کرایو سوسپانسیون را پخش نموده اید، درپچ آنها را محکم کنید
- ۵- کنترل: آخرین قطره مربوط به سوسپانسیون میکروبی را روی یک پلیت حاوی محیط کشت عمومی، کشت خطی دهید تا از خالص بودن سوسپانسیون میکروبی اطمینان حاصل کنید.
- ۶- روی لوله ها یا ویال ها، لیبل دارای مشخصات آمپول و تاریخ تهیه را نصب نمایید.
- ۷- برای تهیه کشت تازه از ذخایر منجمد هر بار فقط یکی از ویالهای منجمد را از فریزر خارج کرده و پس از ذوب بلافاصله درون محیط کشت اختصاصی مایع یا جامد تلقیح کنید. و درون انکوباتور متناسب با شرایط کشت سویه مورد نظر قرار دهید.

۱. ضروری است از محیط کشت توصیه شده در وبگاه مرکز کلکسیون استفاده کنید.

۲. در صورت نیاز به اطلاعات بیشتر با مرکز منطقه ای کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران تماس بگیرید:

شماره تلفن/ نمابر: ۵۶۲۷۵۵۱۰ - ۰۲۱

آدرس وبگاه مرکز منطقه ای کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران <http://ptcc.irostd.org>

مهر تضمین کیفیت

تاریخ: ۹۳/۷/۳۰