INSO
23438
1st Edition
2024

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iran National Standards Organization

استاندارد ملی ایران
۲۳۴۳۸
چاپ اول
۱۴۰۲

Identical with ISO/TS 23034: 2021

فناوری نانو- روش تخمین برداشت سلولی نانومواد کربنی با استفاده از جذب نوری

Nanotechnologies – Method to estimate cellular uptake of carbon nanomaterials using optical absorption

ICS: 07.120

استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۳۴۳۸ (چاپ اول): سال ۱۴۰۲

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب‌غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴(۰۲۶)

رایانامه: standard@inso.gov.ir

وبگاه: http://www.inso.gov.ir

Iran National Standards Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@inso.gov.ir

Website:http://www.inso.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفهٔ تعیین، تدوین، به‌روزرسانی و نشر استانداردهای ملی را بر عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔملی مرتبط با آن رشته طرح و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد(ISO)[1]،کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی(OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی(CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت میکند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (OrganisationInternationale de MetrologieLegals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«فناوری نانو- روش تخمین برداشت سلولی نانومواد کربنی با استفاده از جذب نوری»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
نجفی اصلی پاشاکی، شبنم (دکتری شیمی تجزیه- جداسازی)	مدیر فنی- آزمایشگاه‌های مرکز پژوهش‌های کاربردی علوم زمین البرز
دبیر:	
دارابی، عادله (دکتری فیزیک، حالت جامد)	عضو مستقل
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
احمدی، سارا (دکتری مهندسی مواد)	عضو هیئت علمی- پژوهشگاه استاندارد
اسلامی‌پور، الهه (کارشناسی ارشد زیست‌شناسی)	کارشناس مسئول- گروه استاندارد و ایمنی ستاد توسعه فناوری‌های نانو و میکرو
خوشنویسان، کامیار (دکتری نانوفناوری پزشکی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
رضوی، شبنم (دکتری بیوتکنولوژی پزشکی)	عضو هیئت علمی- دانشگاه علوم پزشکی ایران
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	مشاور- گروه استاندارد و ایمنی ستاد توسعه فناوری‌های نانو و میکرو
ولی‌زاده، علیرضا (دکتری نانوفناوری پزشکی)	مدیرعامل- شرکت داروسازی کارن نانو دارو
یگانه، محمد (دکتری فیزیک- اپتیک)	عضو هیئت علمی- دانشگاه فرهنگیان
ویراستار:	
سیفی، مهوش (کارشناسی ارشد مدیریت دولتی)	مشاور- گروه استاندارد و ایمنی ستاد توسعه فناوری‌های نانو و میکرو

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

پیش‌گفتار ز
مقدمه ح
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد ۱
۲ مراجع الزامی ۱
۳ اصطلاحات، تعاریف و کوته‌نوشت‌ها ۱
۳-۱ اصطلاحات و تعاریف ۲
۳-۲ کوته‌نوشت‌ها ۲
۴ مرور روش ۳
۴-۱ کلیات ۳
۴-۲ جذب نوری نانومواد کربنی ۴
۴-۳ جذب نوری زیست‌مولکول‌ها ۵
۴-۴ تعیین غلظت CNMs در پراکنه با استفاده از جذبایی ۵
۴-۵ مطالعات موردی ۶
۵ مواد و دستگاه‌ها ۶
۵-۱ مواد ۶
۵-۲ دستگاه‌ها ۷
۶ پروتکل آزمون برداشت سلولی ۸
۶-۱ کلیات ۸
۶-۲ آماده‌سازی نمونه ۸
۶-۳ آماده‌سازی منحنی کالیبراسیون پراکنه‌های CNM ۸
۶-۴ کاشت سلولی ۹
۶-۵ تیمار سلول‌ها با تعلیقهٔ آزمون ۹
۶-۶ شمارش سلول ۱۰
۶-۷ شستشوی سلول‌ها و آماده‌سازی لیزات سلولی ۱۰
۶-۸ اندازه‌گیری جذبایی لیزات سلولی ۱۲
۷ منابع تغییرپذیری ۱۲
۸ برونداد داده ۱۳
۸-۱ کلیات ۱۳
۸-۲ تحلیل داده و گزارش‌دهی ۱۳
۸-۳ قالب برگه‌داده ۱۳

عنوان **صفحه**

پیوست الف (آگاهی‌دهنده) مطالعهٔ موردی با SWCNTs ۱۴
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) مطالعهٔ موردی CNHs ۲۱
پیوست پ (آگاهی‌دهنده) مطالعهٔ موردی MWCNTs ۲۶
کتاب‌نامه ۳۱

پیش‌گفتار

استاندارد «فناوری نانو- روش تخمین برداشت سلولی نانومواد کربنی با استفاده از جذب نوری» که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به‌عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تهیه و تدوین شده، در یکصدوسی‌وپنجمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد فناوری نانو مورخ ۱۴۰۲/۱۱/۰۱ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ‌شده در دی ماه ۱۳۹۶، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران براساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم وخدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود، در هنگام تجدیدنظر درکمیسیون فنی مربوط، موردتوجه قرارخواهدگرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO/TS 23034: 2021, Nanotechnologies – Method to estimate cellular uptake of carbon nanomaterials using optical absorption

مقدمه

نانومواد کربنی (CNMs)[1]، از قبیل نانولوله‌های کربنی، کربن سیاه[2]، گرافن و نانوشیپورهای کربنی به‌سبب خواص شیمیایی و فیزیکی غیرمعمول آن‌ها برای کاربردهای متنوعی از جمله در زمینه‌های الکترونیک، انرژی، فناوری نانو و زیست‌شناسی در نظر گرفته شده‌اند. با افزایش محصولات بر پایهٔ نانومادهٔ کربنی در بازار، نگرانی عمومی دربارهٔ مسمومیت‌های احتمالی آن‌ها افزایش یافته است. تخمین میزان CNM مرتبط به سلول‌های هدفدارشده، برای غربالگری سم‌شناختی اولیهٔ CNMs و همچنین برای توسعهٔ کاربردهایی در پزشکی مفید است [4][3][2][1].

برای اندازه‌گیری برداشت[3] سلولی، به‌طور معمول از رزانه‌های[4] فلورسنت و/یا ایزوتوپ‌های رادیواکتیو استفاده شده است. از آن‌جایی که نانومواد کربنی نور را در ناحیهٔ فروسرخ نزدیک (NIR)[5] جذب می‌کنند، ناحیه‌ای که در آن «اجزای‌زیستی»[6] مانند پروتئین و آب موجود در سلول‌ها یا بافت‌ها جذب[7] نور به‌نسبت پایینی دارند، برداشت سلولی نانومواد کربنی را می‌توان از روی جذبایِ[8] «لیزات سلولی»[9] تخمین زد [8][7][6][5].

1- Carbon nanomaterials
2- Carbon black
3- Uptake
4- Dyes
5- Near infrared
6- Bio-components
7- Absorption
8- Absorbance
9- Cell-lysate

فناوری نانو- روش تخمین برداشت سلولی نانومواد کربنی با استفاده از جذب نوری

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، توصیف روش جذب نوری فروسرخ نزدیک به‌منظور تخمین برداشت سلولی برون‌تنی[1] نانومواد کربنی، شامل هر دو نوع درون‌بَری‌شده[2] و/ یا قویا چسبیده به غشای سلولی، از پراکنه‌های مایع است. این یک روش ساده برای غربالگری برداشت نانومواد کربنی است؛ درصورت تمایل به کمّی‌سنجی، آنالیزهای بیشتر با استفاده از یک روش متفاوت می‌تواند مورد نیاز باشد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

درصورتی‌که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۲-۱ استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱، آب- مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

2-2 ISO/TS 80004-3, Nanotechnologies -Vocabulary - Part 3: Carbon nano-objects

یادآوری- استاندارد ملی ایران- ایزو شماره ۳-۸۰۰۰۴ : سال ۱۴۰۲، فناوری نانو- واژه‌نامه- قسمت ۳: نانواشیاء کربنی با استفاده از استاندارد ISO 80004-3: 2020 تدوین شده است.

۳ اصطلاحات، تعاریف و کوته‌نوشت‌ها

در این استاندارد، علاوه‌بر اصطلاحات و تعاریف ارائه‌شده در استاندارد ISO/TS 80004-3، اصطلاحات و تعاریف زیر نیز به‌کار می‌رود[3]:

1- In vitro

2- Internalized

۳- اصطلاحات و تعاریف به‌کاررفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org قابل‌دسترس است.

۳-۱ اصطلاحات و تعاریف

۳-۱-۱

برداشت سلولی

cellular uptake

درون‌بری یا ارتباط[1] یک ماده با یک سلول زنده است.

۳-۱-۲

لیز (کافت) سلولی

cell lysis

تخریب[2] یا فروپاشی[3] سلول‌ها با رهایش محتویات است.

۳-۱-۳

جذبایی

absorbance

معیاری از ظرفیت یک ماده برای جذب نور در یک طول موج مشخص است.

۳-۲ کوته‌نوشت‌ها

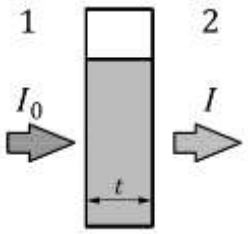
معادل فارسی	اصطلاح انگلیسی	کوته‌نوشت
نانوشیپور کربنی	carbon nanohorn	CNH
نانومادهٔ کربنی	carbon nanomaterial	CNM
نانولولهٔ کربنی	carbon nanotube	CNT
نانولولهٔ کربنی تک‌دیواره	single-wall carbon nanotube	SWCNT
نانولولهٔ کربنی چنددیواره	multi-wall carbon nanotube	MWCNT
محلول بافری نمک فسفات	phosphate-buffered saline	PBS
سدیم دودسیل‌بنزن سولفانات	sodium dodecylbenzene sulfonate	SDBS
فروسرخ نزدیک	near infrared	NIR
فرابنفش	ultraviolet	UV
مرئی	visible	Vis

1- Association
2- Destruction
3- Dissolution

۴ مرور روش

۴-۱ کلیات

هنگامی که یک باریکهٔ نوری از میان یک نمونهٔ محلول می‌گذرد، بخشی از باریکه به‌وسیلهٔ محلول تضعیف می‌شود و باقی آن عبور می‌کند (به شکل ۱ مراجعه شود). میزان تضعیف باریکهٔ نوری به‌وسیلهٔ محلول، به خاصیت خود محلول و ضخامت نمونهٔ محلول مربوط است.



راهنما:

۱ نور فرودی

۲ نور عبوری

شکل ۱ – تضعیف نوری با یک نمونهٔ محلول

جذبایی نوری نسبت مستقیم با غلظت مادهٔ حل‌شده در محلول دارد. اگر غلظت محلول به‌صورت $g.l^{-1}$ بیان شود، رابطهٔ بین جذبایی و غلظت را می‌توان به‌صورت زیر نوشت:

$$A = \log_{10}(I_0/I) = k_m tc \qquad (۱)$$

که در آن:

A جذبایی نوری نمونهٔ محلول است؛

I_0 شار تابشی فرودی است؛

I شار تابشی باریکه‌های عبوری است؛

k_m ضریب جذب‌پذیری[۱] جرمی وابسته به طول‌موج با یکای $l.g^{-1}.cm^{-1}$[۲] است؛

t ضخامت نمونهٔ محلول است؛

c غلظت مادهٔ حل‌شده در نمونهٔ محلول برحسب یکای $g.l^{-1}$ است.

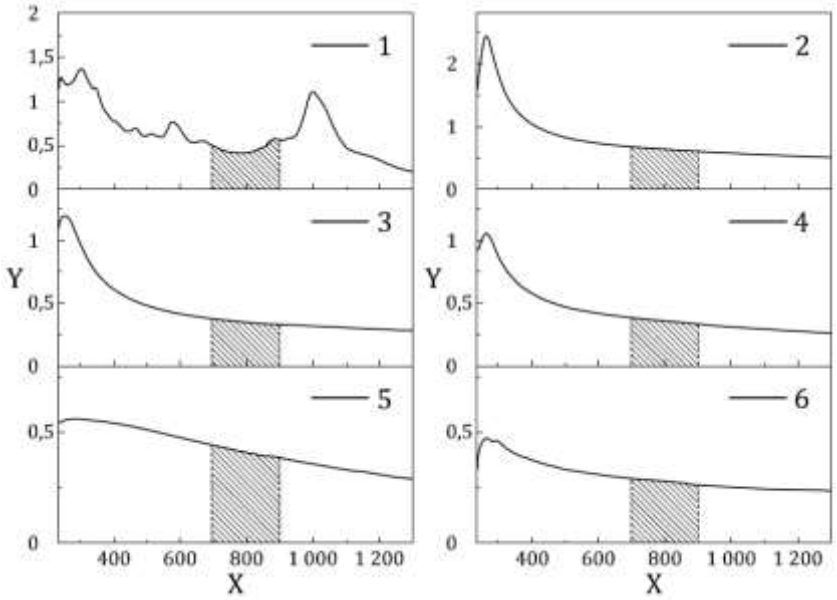
اگر A ، k_m و t معلوم باشند، آن‌گاه می‌توان غلظت مادهٔ حل‌شده در نمونهٔ محلول را به‌دست آورد. A با اندازه‌گیری به‌دست می‌آید، k_m از طریق کالیبراسیون با استفاده از مقدار معلوم مادهٔ حل‌شده در نمونهٔ محلول به‌دست می‌آید و t مقدار ثابت‌شده‌ای است که با طول مسیر نوری کووت در اندازه‌گیری جذبایی تعیین می‌شود.

1- Absorptivity

۲- در منبع استاندارد l (لیتر) در یکای k_m جا افتاده است.

۲-۴ جذب نوری نانومواد کربنی

طیف جذب نوری نانومواد کربنی در پراکنه، قلهٔ جذب شدیدی را در ۳۰۰ nm تا ۲۰۰ nm (۴ eV تا ۶ eV) نشان می‌دهد که به برانگیختگی‌های جمعی سامانه‌های الکترونی π (پلاسمون‌های π)[1] مربوط است [9]. این قلهٔ جذب پلاسمون π را می‌توان در اغلب ترکیبات گرافیتی نیز مشاهده کرد [10]. این قله روی زمینه‌ای عاری از شاخصه‌ای خاص که تا نواحی Vis-NIR و IR گسترده شده، سوار[2] شده است. طیف نوعی SWCNTs، MWCNTs، CNHs، کربن سیاه و گرافن در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. جذبایی گستردهٔ غیرتشدیدی MWCNTs، CNHs، کربن سیاه، گرافن و یا SWCNTs در ناحیهٔ Vis-NIR (برای مثال ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm) ویژگی معمول بیشتر نانومواد کربن‌دار[3] در نمونه‌ها است.



راهنما:

X	طول‌موج (nm)	3	MWCNTs
Y	جذبایی (یکای دلخواه)	4	CNHs
1	SWCNTs مجزا	5	کربن سیاه
2	دسته‌های SWCNT	6	گرافن

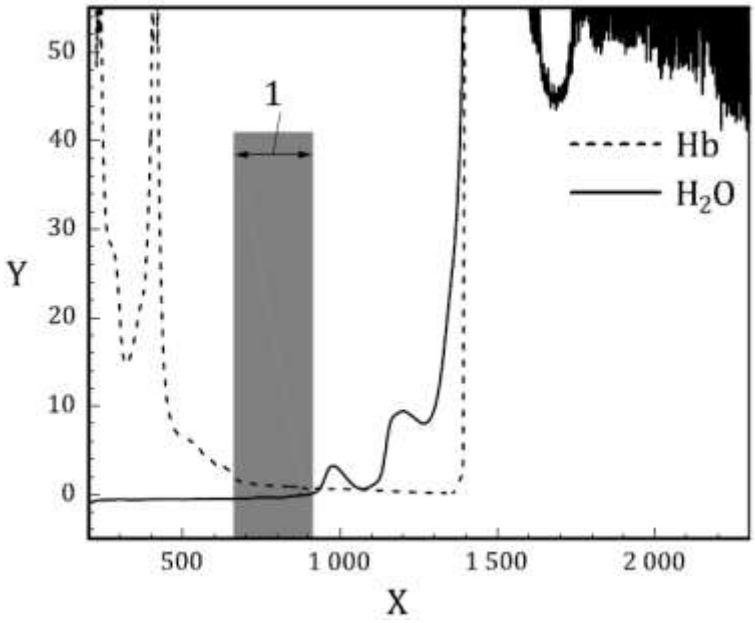
یادآوری- نواحی هاشورخورده جذبایی هریک از نانومواد کربنی در ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm را نشان می‌دهند.

شکل ۲ – طیف جذبی نوعی SWCNTs مجزا، دسته‌های SWCNT، MWCNTs، CNHs، کربن سیاه و نانوصفحه‌های گرافنی در پراکنه‌ها

1- π-plasmons
2- Superimposed
3- Carbonaceous

۳-۴ جذب نوری زیست‌مولکول‌ها

لیزات سلولی می‌تواند اجزایی زیستی از قبیل پروتئین‌ها، آمینو اسیدها، اسیدهای چرب و DNA داشته باشد. این اجزای زیستی می‌توانند در گسترهٔ طول‌موجی ۲۰۰ nm تا ۶۰۰ nm نور جذب کنند. آب در IR (۱۰۰۰ nm < طول‌موج) جذب دارد (به شکل ۳ مراجعه شود). از آن‌جایی که اجزای زیستی در گسترهٔ ۶۵۰ nm تا ۹۰۰ nm جذب کمی دارند، همواره از این گستره برای تشخیص استفاده شده و به‌عنوان «پنجرهٔ درمانی»[1] نیز خوانده می‌شود [11].



راهنما:

X طول‌موج (nm)

Y جذبایی (یکای اختیاری)

1 گسترهٔ جذب کم

شکل ۳ – طیف جذبی هموگلوبین (Hb) و آب

۴-۴ تعیین غلظت CNMs در پراکنه با استفاده از جذبایی

همان‌گونه که در بالا نشان داده شد، اگر طول‌موج نور و طول مسیر نور ثابت باشد، میزان نور جذب‌شدهٔ یک پراکنهٔ معین CNM نسبت مستقیمی با غلظت CNMs پراکنده‌شده خواهد داشت. بدین‌ترتیب بر اساس منحنی کالیبراسیونی که با استفاده از یک مقدار معلوم غلظت و جذبایی متناظر آن به‌دست می‌آید، می‌توان غلظت مجهول پراکنهٔ CNMs را از روی جذبایی آن تعیین کرد. از آن‌جایی که جذبایی بیشتر انواع CNMs در ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm قرار دارد، گستره‌ای که اجزای لیز سلولی در آن جذبایی ندارند، هر طول موجی در این گستره (برای مثال ۷۵۰ nm) را می‌توان برای تعیین غلظت پراکنهٔ CNMs انتخاب کرد.

1- Therapeutic window

یادآوری- این روش به نانومواد کربنی که در ناحیهٔ NIR از ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm جذب شدیدی دارند، محدود است، اما برای برخی از انواع نانومواد کربنی مانند نانوالماس و نانوگرافن اکسید که در این ناحیه جذب کمی دارند، مناسب نخواهد بود.

۴-۵ مطالعات موردی

مطالعات موردی با SWCNTs، CNHs و MWCNTs به‌ترتیب در پیوست‌های **الف**، **ب** و **پ** ارائه شده‌اند.

۵ مواد و دستگاه‌ها

۱-۵ مواد

۱-۱-۵ مواد شیمیایی

۱-۱-۱-۵ آب، آب خالص یون‌زدوده و سترون‌شده[1]، درجهٔ ۱، مطابق با استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱.

۲-۱-۱-۵ محیط کشت، بدون سرم یا با سرمی که الزامات رشد ردهٔ سلولی انتخاب‌شده را برآورده می‌کند.

۳-۱-۱-۵ PBS (pH = ۷٫۴)

۴-۱-۱-۵ واکنشگر لیز سلولی، محلول بافر بی‌رنگی که حاوی شوینده‌هایی برای لیز/ استخراج سلول پستاندار است.

۵-۱-۱-۵ محلول SDBS، پودر **SDBS** حل‌شده در آب خالص یون‌زدوده با غلظت ۵۰ mg/ml است.

۶-۱-۱-۵ تریپسین-EDTA (۰٫۲۵ ٪)

۲-۱-۵ ردهٔ سلولی

رده‌های سلولی پایدار (نامیرا)[2] ترجیح داده می‌شوند و باید از بانک‌های سلولی شناخته‌شده تهیه شوند. این رده‌های سلولی می‌توانند سلول‌های چسبنده یا سلول‌های شناور باشند.

1- Sterilized
2- Established

۵-۲ دستگاه‌ها

۵-۲-۱ طیف‌سنج UV-Vis-NIR

باید از یک طیف‌نورسنج[1] که محدودهٔ طول‌موجیِ گسترده‌ای از فرابنفش تا NIR را پوشش می‌دهد، استفاده شود. توصیه می‌شود تجهیزات در محیطی تمیز، به‌دور از هرگونه نوفهٔ[2] الکتریکی، لرزه‌های مکانیکی، نورمستقیم خورشید و غیره نصب شوند.

طیف‌نورسنج باید ۳۰ min پیش از اندازه‌گیری روشن شود تا طیف مبنا (خط مبنا)[3] تثبیت شود. طیف‌نورسنج باید در مقیاس جذبایی که در آن ممکن است از یک فیلتر جذبی با چگالی نوری خنثی (فیلتر کاهندهٔ نور) با مقداری نزدیک به صفر استفاده شود، کالیبره شود. باید یک طیف جذبی از پراکنهٔ آبی CNMs نسبت به محلول مرجعی که برای فروپاشی سلول‌ها به کار می‌رود [برای مثال محلول ترکیبی SDBS و واکنشگر لیز سلولی (۱:۱)]، به‌دست آید.

۵-۲-۲ کووت برای اندازه‌گیری جذب نوری

کووت کوارتز.

۵-۲-۳ گرم‌خانه[4]

دمای ۳۷ °C، مرطوب‌شده، CO_2/air ٪ ۵.

۵-۲-۴ ظروف کشت

از پلیت‌های تک‌چاهک یا چندچاهک می‌توان استفاده کرد. تعداد ۶ پلیت چندچاهک با کف صاف توصیه می‌شود.

۵-۲-۵ گریزانه (سانتریفیوژ)

لوله‌های گریزانه: لوله‌های ۱۳ میلی‌لیتری و میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری گریزانه، سترون‌شده.

گریزانه: گریزانهٔ یخچال‌دار[5] مجهز به چرخانه‌هایی[6] با لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری و میکرولوله‌های ۱ میلی‌لیتری تا ۲ میلی‌لیتری گریزانه. توصیه می‌شود سرعت گریزانه برحسب نیروی گرانشی g ۱۵۰ باشد.

1- Spectrophotometer
2- Noise
3- Baseline
4- Incubator
5- Refrigerated
6- Rotors

۵-۲-۶ همگن‌ساز[1]

یک دستگاه امواج‌دهی فراصوتی با یک نوک[2] شیپوری با کمینه توان خروجی ۲۰۰ W.

برای سهولت کار، دستگاهی با نوک‌های متعدد توصیه می‌شود.

۵-۲-۷ سلول‌شمار[3]

سلول‌شمار خودکار یا گویچه‌شمار[4].

۶ پروتکل آزمون برداشت سلولی

۶-۱ کلیات

برای باز کردن ذخیرهٔ[5] یخ‌زدهٔ سلول‌ها، اصول پایهٔ روش‌های کشت سلولی [12][13] را به‌نحوی دنبال کنید که بتوان برداشت سلولی برای CNM را انجام داد. هنگام استفاده از پلیت‌های ۶ چاهک برای کشت سلولی، فرایندهای توضیح‌داده‌شده در زیر، توصیه می‌شوند. این فرایندها را می‌توان مطابق با رده‌های سلولی و نوع ظروف کشت سلولی اصلاح کرد.

این روش برای تمامی انواع سلول‌ها کاربرد دارد.

۶-۲ آماده‌سازی نمونه

تعلیقه‌های CNM برای آزمون برداشت سلولی باید همگن و در محلول آبی پایدار باشند. تعلیقه می‌تواند حاوی یک پراکنش‌یار[6] از قبیل آلبومین سرم گاوی[7] یا پلی‌اتیلن گلیکول و غیره باشد. پیش از استفاده باید غلظت CNMs معین باشد. پیشنهاد می‌شود از پراکنه‌های تازه آماده‌شدهٔ CNM استفاده شود.

۶-۳ آماده‌سازی منحنی کالیبراسیون پراکنه‌های CNM

با رقیق کردن تعلیقهٔ آزمون (به شکل ۵-۱-۱ مراجعه شود) با محلولی که برای حل کردن سلول‌ها به‌کار می‌رود [برای مثال محلول ترکیبی SDBS و واکنشگر لیز سلولی (۱:۱)]، پراکنه‌های CNM را با غلظت‌های متنوعی مانند ۰ µg/ml، ۰٫۱ µg/ml، ۰٫۵ µg/ml، ۱ µg/ml، ۲ µg/ml، ۵ µg/ml و ۱۰ µg/ml آماده کنید. با استفاده از طیف‌سنج UV-Vis-NIR، داده‌های جذبایی را در یک طول موج ثابت در ناحیهٔ ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm، برای مثال ۷۵۰ nm، به‌ازای هر غلظت پراکنهٔ CNM موجود در کووت گردآوری

1- Homogenizer
2- Tip
3- Cell counter
4- Hemacytometer
5- Stock
6- Dispersant
7- Bovine

کنید. منحنی کالیبراسیون را با رسم جذبایی در طول‌موج انتخاب‌شده برحسب غلظتِ معلوم CNM آماده کنید.

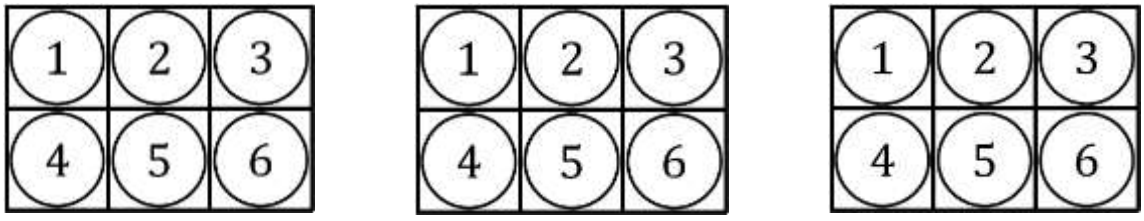
یادآوری ۱- منحنی کالیبراسیون غلظت CNM برحسب جذبایی به مشخصه‌های CNMs و پراکنه‌های آن‌ها وابسته است.

برای هر یک از انواع CNM به‌کاررفته در آزمایش برداشت سلولی باید یک منحنی کالیبراسیون آماده شود.

یادآوری ۲- جذب CNMs در ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm جذبایی تجمعی[1] کل مادهٔ کربن‌دار شامل ناخالصی‌هایی از قبیل کربن بی‌شکل[2]، گرافیت و غیره است. ترجیح این است که از نمونه‌های خالص‌سازی‌شدهٔ CNM استفاده شود.

۶-۴ کاشت سلولی

کاشت سلول‌ها باید در محیط کشت به‌اندازهٔ $۲٫۰ \times ۱۰^{۵}$ تا $۸٫۰ \times ۱۰^{۵}$ در ۳ ml از محیط کشت در هر چاهک پلیت‌های ۶ چاهک انجام گیرد و سلول‌ها باید در یک گرم‌خانهٔ مرطوب‌شده در ۳۷ °C با ۵ ٪ CO_2 به‌مدت ۲۴ h گرم‌خانه‌گذاری شوند. برای اندازه‌گیری برداشت سلولی باید سه پلیت از سلول‌ها، به‌عنوان سه گروه، آماده شود؛ یک پلیت برای شمارش سلولی، یکی به‌عنوان کنترل لیز سلولی و یکی برای آزمون CNM (به شکل ۴ مراجعه شود).



الف- کنترل برای شمارش سلول **ب- کنترل (n = ۶)** **پ- آزمون CNM (n = ۶)**

یادآوری- هر پلیت متناظر با یک کنترل برای شمارش سلول یا کنترل برای لیز سلولی یا برای آزمون CNM است.

شکل ۴- طرحواره‌ای از پلیت‌های به‌کاررفته برای کشت سلولی

۶-۵ تیمار[3] سلول‌ها با تعلیقهٔ آزمون

تعلیقهٔ آزمون CNM یا PBS (کنترل) را مستقیماً به محیط سلولی اضافه کنید و اطمینان حاصل کنید که غلظت CNM در محیط سلولی کمتر از غلظت سمی (زنده‌مانی[4] سلول پس از تیمار با تعلیقهٔ آزمون کمتر از ٪ ۹۵ است) برای سلول‌ها باشد. پلیت‌ها را به‌آرامی به گرم‌خانه منتقل و سلول‌ها را به‌مدت ۲۴ h تا ۴۸ h در آن نگهداری کنید. در اینجا، پیشنهاد می‌شود که غلظت CNMs در محدودهٔ ۱۰ µg/ml تا ۱۰۰ µg/ml

1- Cumulative
2- Amorphous
3- Treatment
4- Viability

باشد [14]. بااین‌حال، این غلظت باید به‌طور خاص برای هر نوع سلول و مادهٔ کربنی تنظیم شود و اطمینان حاصل شود که زنده‌مانی سلول بزرگ‌تر از ٪ ۹۵ نمونهٔ کنترل است. زنده‌مانی سلول را می‌توان با استفاده از واکنشگرهای سنجش تکثیر سلولی از قبیل سنجش WST-1 یا MTT مطابق با پروتکل ارائه‌شده توسط سازنده، تخمین زد (می‌توان به سنجش MTS در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۳۱۰۸: سال ۱۴۰۰مراجعه کرد).

۶-۶ شمارش سلول

تعداد سلول‌ها در هر چاهک را می‌توان با یک سلول‌شمار یا گویچه‌شمار تأیید کرد [12][13]. جزئیات روش اجرایی در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۹۹۵۹: سال۱۳۹۷ شرح داده شده است.

۶-۷ شستشوی سلول‌ها و آماده‌سازی لیزات سلولی

۶-۷-۱ کلیات

روش‌های اجرایی شستشو که در ادامه آمده با جزئیات شرح داده شده است، زیرا مرحلهٔ مهمی در این پروتکل هستند. با این حال، فرایندهای مشروح زیر هنگام استفاده از ظروف ۶ چاهک توصیه می‌شوند. این فرایندها را می‌توان مطابق با رده‌های سلولی و نوع ظروف کشت تغییر داد.

۶-۷-۲ برای سلول‌های چسبنده

الف- پس از گرم‌خانه‌گذاری توضیح داده‌شده در بالا (به زیربند ۶-۵ مراجعه شود)، به‌آرامی محیط کشت را به‌همراه یا بدون CNMs خارج کنید.

ب- برای شستشو، به‌آرامی ml ۲ از PBS را در هر چاهک پیپت کنید. برای انجام این کار محلول را به دقت از کنارهٔ هر چاهک اضافه کنید تا تخریب سلول‌های چسبنده کمینه شود. به‌آرامی با پیپت ml ۲ از PBS را خارج کنید.

پ- مرحلهٔ **ب** را سه بار تکرار کنید.

یادآوری- درصورت لزوم می‌توان برای برخی انواع سلول با کندن[1] سلول‌ها با یک «عامل جداکننده»[2] مانند تریپسین و سپس دو بار شستشوی سلول‌ها با PBS با گریزانه، مراحل ب و پ را اصلاح کرد.

ت- مقدار ml ۰٫۵ از محلول واکنشگر لیز سلولی را به هر چاهک اضافه کنید.

ث- پلیت‌ها را در یک «محفظهٔ زیستی ایمن با جریان خطی»[3] در دمای اتاق به مدت min ۳۰ نگهداری کنید.

1- Harvesting
2- Detachment agent
3- Laminar flow cabinet

ج- محلول موجود در هر چاهک را با چندین بار پیپت کردن به آرامی مخلوط کنید. محلول را از هر چاهک، تک تک به میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری انتقال دهید.

چ- مقدار ۰٫۵ ml از محلول SDBS را به هر چاهک اضافه کنید و چندین بار پیپت کنید تا هر ماده‌ای که در کناره یا ته هر چاهک وجود دارد، در محلول پراکنده شود.

ح- از هر چاهک محلول را خارج کنید و آن را به هر یک از میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری مربوط اضافه کنید.

خ- میکرولولهٔ ۱٫۵ میلی‌لیتری را در آب یخ قرار دهید و محلول‌ها را به‌صورت یک به یک با یک همگن‌ساز یک‌نوکی یا به‌صورت چندتایی با همگن‌ساز چندنوکی تیمار کنید (به زیربند ۵-۲-۶ مراجعه شود).

۶-۷-۳ برای سلول‌های شناور

الف- پس از گرم‌خانه‌گذاری (به زیربند ۶-۵ مراجعه شود)، به‌آرامی محیط کشت را به‌همراه یا بدون CNMs به یک لولهٔ ۱۵ میلی‌لیتری گریزانه منتقل کنید.

ب- هر چاهک را با ۱ ml از محیط کشت تازه شستشو دهید و به لولهٔ گریزانهٔ ۱۵ میلی‌لیتری متناظر آن منتقل کنید.

پ- تعلیقهٔ سلولی را به مدت ۴ min در ۵ °C در دستگاهی با ۱۵۰ g گریزانه‌گذاری کنید.

ت- «مایع روماند»[1] را خارج کنید.

ث- به هر لوله ۳ ml از PBS اضافه کنید و با پیپتی با سر ۱ میلی‌لیتری سلول‌ها را دوباره پراکنده کنید.

ج- فرایند بالا را از پ تا ث سه بار تکرار کنید تا CNMs بیرون سلول‌ها خارج شوند.

چ- مقدار ۰٫۵ ml از محلول واکنشگر لیز سلولی را به هر یک از رسوب‌های سلولی به‌دست‌آمده اضافه کنید.

ح- سلول‌ها را با چندین بار پیپت کردن پراکنده کنید و سپس لوله‌ها را در یک محفظهٔ زیستی ایمن با جریان خطی در دمای اتاق به مدت ۳۰ min نگهداری کنید.

خ- پس از چندین بار پیپت کردن، یکی یکی محلول توضیح‌داده‌شده در بالا را از هر لوله به میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری منتقل کنید.

د- هریک از لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری گریزانه را با ۰٫۵ ml از محلول SDBS شستشو دهید و سپس آن‌ها را به‌ترتیب به میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری توضیح‌داده‌شده در بالا منتقل کنید.

1- Supernatant

ذ- میکرولولهٔ ۱٫۵ میلی‌لیتری را در آب یخ قرار دهید و محلول را با یک همگن‌ساز عمل‌آوری کنید (به زیربند ۵-۲-۶ مراجعه شود).

۶-۸ اندازه‌گیری جذبایی لیزات سلولی

طول‌موجِ اندازه‌گیری را می‌توان روی طول‌موجی در محدودهٔ ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm (برای مثال ۷۵۰ nm) تنظیم کرد. نمونهٔ مرجع شاهدِ کنترل باید با استفاده از محلول ترکیبی SDBS و واکنشگر لیز سلولی (۱:۱) اندازه‌گیری شود.

لیزات سلولی را به یک طیف‌نورسنج (به زیربند ۵-۲-۲ مراجعه شود) منتقل کنید (به مورد خ در زیربند ۶-۷-۲ یا مورد ذ در زیربند ۶-۷-۳ مراجعه شود) و جذبایی هر نمونه را به‌طور مجزا در طول‌موجی در ۷۰۰ nm تا ۹۰۰ nm (برای مثال ۷۵۰ nm) اندازه‌گیری کنید.

۷ منابع تغییرپذیری[1]

در غربالگری برداشت سلولی CNMs با استفاده از روش پیشنهادی این استاندارد، منابع تغییرپذیری در نتایج را می‌توان در موارد زیر یافت:

الف- مقدار تخمینیِ برداشت سلولی CNMs با روش ارائه‌شده در این استاندارد، هم شامل CNMs و هم شامل ناخالصی‌هایی به‌جز CNM است.

ب- اگر لیزات‌های سلولی به‌صورت همگن پراکنده نشده باشند، ممکن است به‌دلیل تضعیف شدت نور بر اثر پراکندگی نور، نتیجهٔ اندازه‌گیری نادرست باشد.

پ- تعداد سلول‌ها در گروه آزمون CNM ممکن است با گروه کنترل (بدون افزودن CNMs) تفاوت داشته باشد. توصیه می‌شود که غلظت پراکنهٔ CNM آزمون کمتر از مقداری باشد که مرگ سلولی ایجاد می‌کند.

ت- ممکن است شرایط رشد سلول بر نتایج برداشت CNMs اثر بگذارد.

ث- ممکن است در نگهداری بلندمدت، نتیجه تحت‌تأثیر تغییر اندازهٔ انبوههٔ CNMs در پراکنهٔ آزمون قرار گیرد.

ج- ممکن است برخی از CNMs پس از شستشوی سلولی همچنان چسبیده به غشای سلولی باقی بمانند و در اندازه‌گیری برداشت به‌حساب آورده شوند.

1- Variability

۸ برونداد داده

۸-۱ کلیات

پیشنهاد می‌شود نتایج ارزشیابی و اندازه‌گیری به‌دست‌آمده بر طبق این استاندارد، در قالب زیر گزارش شود.

۸-۲ تحلیل داده و گزارش‌دهی

الف- طول‌موج انتخاب‌شده را ثبت کنید.

ب- مقادیر جذبایی لیزات‌های سلولی در طول‌موج انتخاب‌شده (برای مثال ۷۵۰ nm) را که در زیربند ۶-۸ به‌دست آمدند، ثبت کنید.

پ- غلظت CNMs در یک محلول لیز سلولی را بر مبنای کالیبراسیون به‌دست آمده در زیربند ۶-۳ محاسبه کنید.

ت- کمیت CNMs هر سلول را با استفاده از نتایج به‌دست آمده در قسمت ب تقسیم بر تعداد سلول‌ها که در زیربند ۶-۶ به‌دست آمده، محاسبه کنید. درصورت عدم نیاز، می‌توان این داده‌ها را حذف کرد.

ث- گزارش نتایج شامل داده‌هایی است که در جدول ۱ نشان داده شده است.

۸-۳ قالب برگه‌داده

برای گزارش‌دهی از قالب برگه‌دادهٔ زیر استفاده می‌شود.

جدول ۱- نمونه الگویی برای نتایج برداشت سلولی CNMs

		۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط (Ac)	SD
کنترل	**Ac**								
آزمون CNMs	**Atest**								
	Atest-Ac								
	CNMs µg/well								
	CNMs pg/cell								

SD : انحراف معیار.

Ac : جذبایی در ۷۵۰ nm برای لیزات سلولی به‌دست‌آمده از گروه‌های کنترل.

Atest : جذبایی لیزات سلولی در ۷۵۰ nm به‌دست‌آمده از آزمون‌های CNM.

CNMs (µg/well) : مقدار تخمینی CNM در هر چاهک بر اساس خط کالیبراسیون (به زیربند ۶-۳ مراجعه شود) و جذبایی.

CNMs (pg/cell) : مقدار CNM برحسب µg/well تقسیم بر تعداد سلول به‌دست‌آمده در زیربند ۶-۶.

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

مطالعهٔ موردی با SWCNTs

الف-۱ مواد

الف-۱-۱ SWCNTs، که با روش «رشد فوق‌العاده»[1] تولید شده باشند (Cat. HT0209, AIST, Japan).

الف-۱-۲ پراکنهٔ CNTs، SWCNTs که با غلظت ۱ mg/ml به‌صورت همگن در محلول BSA پراکنده شده‌اند[17][18].

الف-۱-۳ ردهٔ سلولی، RAW 264.7 ، ماکروفاژ مونوسیت موش؛ چسبنده؛ «مجموعهٔ احراز صلاحیت‌شدهٔ کشت سلولی اروپا» (ECACC)[2]، بریتانیا[3].

الف-۱-۴ واکنشگر لیز سلولی، CelLytic M (Sigma, C2978)[4]

الف-۱-۵ محلول SDBS، پودر SDBS حل‌شده در آب خالص یون‌زدوده با غلظت ۵۰ mg/ml.

الف-۱-۶ دیگر واکنشگرها برای کشت سلولی به همان صورتی هستند که در این استاندارد توضیح داده شده‌است.

الف-۲ روش اجرایی

الف-۲-۱ آماده‌سازی خط کالیبراسیون

با رقیق‌سازی تعلیقهٔ آزمون با محلول ترکیبی SDBS و واکنشگر لیز سلولی (۱:۱) پراکنه‌هایی از SWCNT با غلظت‌های ۰ µg/ml، ۰٫۱ µg/ml، ۰٫۲ µg/ml، ۰٫۵ µg/ml، ۱ µg/ml، ۵ µg/ml و ۱۰ µg/ml آماده شدند. به ازای هر غلظت، سه نمونهٔ موازی از پراکنه‌های رقیق‌شدهٔ SWCNTs تهیه شد. مقادیر جذبایی پراکنه‌های SWCNTs در کووت در ۷۵۰ nm با استفاده از طیف‌سنج UV-Vis-NIR اندازه‌گیری شده و در جدول الف-۱ ثبت شدند. خط کالیبراسیون با رسم مقدار متوسط جذبایی برحسب غلظت مطابق شکل زیر به‌دست آمد (به شکل الف-۱ مراجعه شود).

1- Super-growth

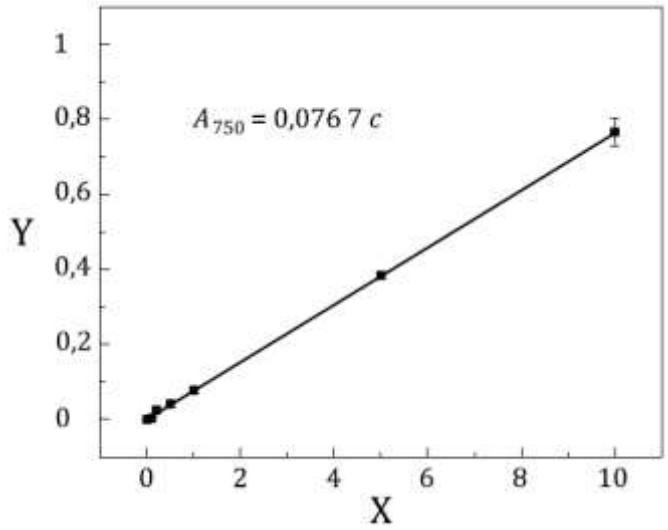
2- European Collection of Authenticated Cell Cultures

۳- ردهٔ سلولی Raw 264.7 مثالی از یک محصول مناسب موجود در بازار است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به منزلهٔ تایید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد نیست.

۴- واکنشگر CelLytic M مثالی از یک محصول مناسب موجود در بازار است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به منزلهٔ تایید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد نیست.

جدول الف-۱ – جذبایی پراکنهٔ آزمون CNT در ۷۵۰ nm به ازای غلظت‌های مختلف

	SWCNTs µg/ml						
	۰	۰/۱	۰/۲	۰/۵	۱	۵	۱۰
جذبایی در ۷۵۰ nm	-۰/۰۰۴۷	۰/۰۰۳۲	۰/۰۲۸	۰/۰۳۶۰	۰/۰۶۸۵	۰/۳۷۴۵	۰/۷۶۸۱
	۰/۰۰۲۱	۰/۰۰۱۴	۰/۰۱۹	۰/۰۳۵۵	۰/۰۸۲۰	۰/۳۹۱۱	۰/۷۶۶۲
	۰/۰۰۲۶	۰/۰۰۳۸	۰/۰۲۵	۰/۰۵۱۲	۰/۰۸۲۵	۰/۳۸۶۳	۰/۷۶۶۵
میانگین	۰	۰/۰۰۲۸۳۴	۰/۰۲۴	۰/۰۴۰۹	۰/۰۷۷۷	۰/۳۸۳۹	۰/۷۶۶۹
SD	۰/۰۰۴۱۳۶	۰/۰۰۱۲۷۰	۰/۰۰۴۶	۰/۰۰۸۹	۰/۰۰۷۹	۰/۰۰۸۵	۰/۰۰۱۰۲



راهنما:

X غلظت (µg/ml)

Y جذبایی

A_{750} جذبایی در ۷۵۰ nm

c غلظت

شکل الف-۱- منحنی کالیبراسیون جذبایی در ۷۵۰ nm برحسب غلظت پراکنهٔ SWCNT

الف-۲-۲ روش اجرایی آزمون

الف-۲-۲-۱ آزمون کنترل برای وارسی کاربردپذیری روش اندازه‌گیری

فرایند مطابق بند ۶ با اعمال اصلاحات زیر انجام می‌شود.

الف- سلول‌های RAW 264.7 به تعداد $۳٫۳ \times ۱۰^{۵}$ cells/well روی یک پلیت ۶ چاهک کاشته و به مدت ۴۸ h گرم‌خانه‌گذاری می‌شوند.

ب- پس از گرم‌خانه‌گذاری، به‌آرامی محیط کشت را خارج کنید.

پ- به‌آرامی به هر چاهک ml ۲ از PBS اضافه کرده و سپس آن را خارج کنید. این فرایند را سه بار تکرار کنید.

ت- به هر چاهک ml ۰٫۵ از CelLytic M اضافه کنید.

ث- پلیت‌ها را در یک محفظهٔ زیستی ایمن با جریان خطی در دمای اتاق به‌مدت min ۳۰ قرار دهید.

ج- پس از چندین بار پیپت کردن، محلول توضیح داده‌شده در بالا را یکی یکی از هر چاهک به میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری منتقل کنید.

چ- به هر چاهک ml ۰٫۵ از محلول SDBS اضافه کنید و چندین بار پیپت کنید.

ح- محلول را از هر یک از چاهک‌ها خارج کرده و به‌ترتیب به هریک از میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری (مرحلهٔ ج) اضافه کنید.

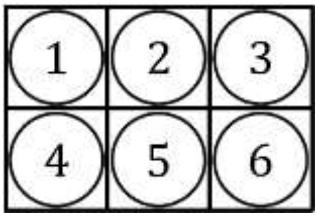
خ- پراکنهٔ SWCNTs (۱ mg/ml) را به لیزات‌های سلولی توضیح‌داده‌شده در بالا که در میکرولوله‌های ۱٫۵ میلی‌لیتری قرار دارند، اضافه کنید تا اطمینان حاصل شود که غلظت SWCNTs در لیزات‌های سلولی به‌صورت µg/ml ۰، µg/ml ۱، یا µg/ml ۵ است. دفعات آزمون به‌صورت $n = ۳$ تنظیم می‌شود.

د- میکرولولهٔ ۱٫۵ میلی‌لیتری را در آب یخ قرار دهید و محلول را با یک همگن‌ساز (به زیربند ۵-۲-۶ مراجعه شود) به‌مدت min ۱۰ در W ۲۷۰ عمل‌آوری کنید.

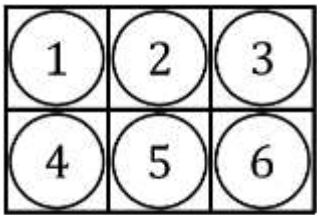
ذ- جذبایی لیزات‌های سلولی را در nm ۷۵۰ اندازه‌گیری کرده و مقدار SWCNTs در لیزات‌های سلولی را محاسبه کنید.

الف-۲-۲-۲ آزمون برداشت سلولی

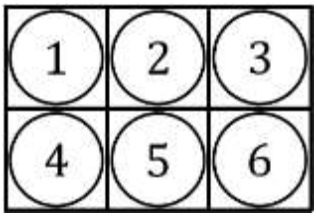
الف- همان‌گونه که در شکل الف-۲ نشان داده شده، از سه پلیت ۶ چاهک برای سه گروه (دو گروه برای کنترل و یکی برای آزمون SWCNTs) استفاده می‌شود. پراکنهٔ سلولی (در حدود ml/ $۱٫۱ \times ۱۰^{۵}$، ml ۳) در هر یک از چاهک‌های پلیت ۶ چاهک کاشته و به‌مدت h ۲۴ گرم‌خانه‌گذاری می‌شود.



الف- کنترل (برای شمارش سلول)



ب- کنترل (n = ۶)



پ- آزمون CNT (n = ۶)

یادآوری- هر پلیت متناظر با یک کنترل برای شمارش سلول یا کنترل برای لیز سلولی یا برای آزمون CNT است.

شکل الف-۲ - طرحواره‌ای از پلیت‌های به‌کاررفته برای کشت سلولی

ب- محیط کشت را با پراکنهٔ آزمون SWCNTs (۰٫۰۵ mg/ml) در محیط کشت) یا محیط کشت تازه (کنترل) جایگزین کنید.

پ- پلیت‌ها را به‌آرامی به گرم‌خانه منتقل و سلول‌ها را به‌مدت ۲۴ h گرم‌خانه‌گذاری کنید.

ت- پس از گرم‌خانه‌گذاری توضیح داده‌شده در بالا، تعداد سلول‌های هر چاهک کنترل (مربوط به شمارش سلول) را با یک سلول‌شمار شمارش کنید (به زیربند ۶-۶ مراجعه شود).

ث- لیزات‌های سلولی را برای گروه‌های کنترل و آزمون CNT براساس روش اجرایی زیربند ۶-۷-۲ آماده کنید.

ج- جذبایی لیزات سلولی هر چاهک را اندازه‌گیری کنید.

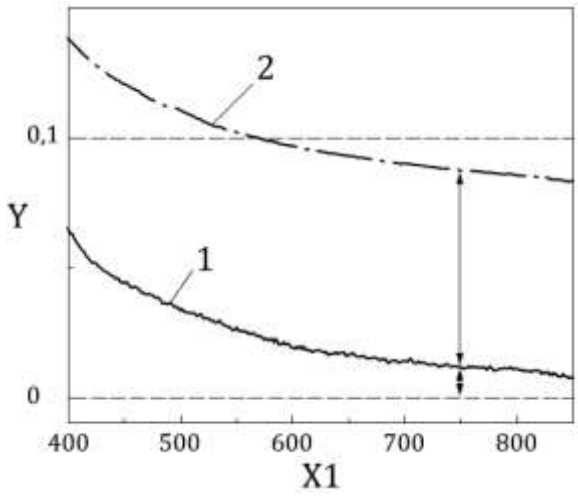
الف-۳ نتیجهٔ آزمون

الف-۳-۱ نتایج آزمون کنترل

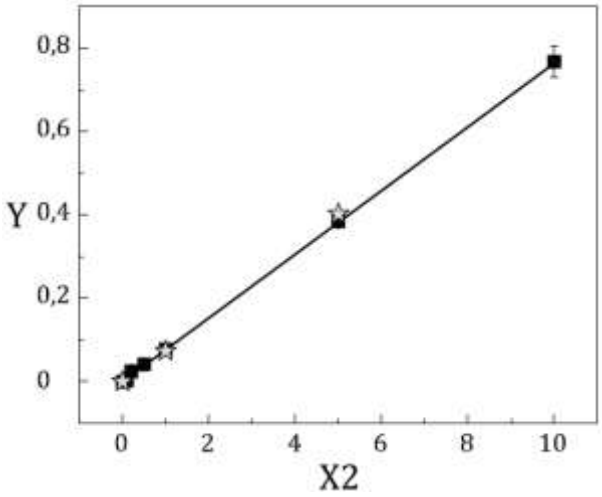
نتایج اندازه‌گیری در جدول الف-۲، شکل الف-۳ و جدول الف-۳ به‌صورت زیر نشان داده شده‌اند.

جدول الف-۲- جذبایی پس‌زمینهٔ لیزات سلولی

کنترل	شمارهٔ چاهک			
	۱	۲	۳	متوسط (Ac)
A750	۰٫۰۲۴۹	۰٫۰۱۰۳۵	۰٫۰۱۸۹۷	۰٫۰۱۸۰۷



الف- طیف نوعی جذب نوری یک لیزات سلولی (۱) و پس از افزودن پراکنهٔ SWCNTs (۲)



ب- نتایج اندازه‌گیری جذبایی در ۷۵۰ nm برای SWCNTs با غلظت‌های معلوم (۰ µg/ml، ۱ µg/ml و ۵ µg/ml) در لیزات‌های سلولی که با نقطه (ستاره) روی منحنی کالیبراسیون پراکنهٔ SWCNTs نشان داده شده‌اند

راهنما:

X1	طول‌موج (nm)	1	لیزات سلولی
X2	غلظت (µg/ml)	2	مقدار ۱ µg/ml از SWCNT
Y	جذبایی		

شکل الف-۳- ارزشیابی کاربردپذیری روش اندازه‌گیری

جدول الف-۳- جذبایی پراکنهٔ آزمون SWCNT در ۷۵۰ nm

	مقدار معلوم µg/ml		
	۰	۱	۵
Atest	۰٫۰۱۹۱	۰٫۰۹۲۲	۰٫۴۲۰۱
Atest-Ac	۰٫۰۰۱۰	۰٫۰۷۴۱۳	۰٫۴۰۲
اندازه‌گیری‌شده µg/ml	۰٫۰۱۳۴	۰٫۹۷	۵٫۲۴
خطا	٪ ±۱٫۳۴	٪ ±۳	٪ ±۴٫۸

این نتیجه نشان داد، هنگامی که غلظت SWCNTs در لیزات سلولی بیشتر از ۱ µg/ml باشد، خطای اندازه‌گیری کمتر از ٪ ۵ خواهد بود.

الف-۳-۲ نتایج آزمون برداشت SWCNT

الف-۳-۲-۱ شمارش سلول

شمارش سلول‌ها در هر چاهک از گروه کنترلِ شمارش، با یک سلول‌شمار انجام می‌شود (به جدول الف-۴ مراجعه شود).

جدول الف-۴- تعداد سلول‌ها پس از گرم‌خانه‌گذاری

	شمارهٔ چاهک						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط
تعداد سلول‌ها در هر چاهک $\times 10^5$	۵٫۷۱	۶٫۱۵	۵٫۸۴	۵٫۹۴	۶٫۱۳	۵٫۹۶	۵٫۹۵

الف ۳-۲-۲ آماده‌سازی لیزات سلولی و اندازه‌گیری جذبایی

فرایندهای آماده‌سازی لیزات سلولی و اندازه‌گیری جذبایی مطابق روش اجرایی زیربندهای ۶-۷ و ۶-۸ انجام می‌گیرد.

جدول الف- ۵- نتایج برداشت سلولی SWCNTs

		شمارهٔ چاهک							
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط (Ac)	SD
کنترل	**Ac**	۰٫۰۱۸۳	۰٫۰۲۱۸	۰٫۰۱۷۶	۰٫۰۱۸۷	۰٫۰۱۹۳	۰٫۰۲۳۴	۰٫۰۱۹۸	۰٫۰۰۲۳
آزمون CNTs	**Atest**	۰٫۲۵۰۶	۰٫۲۱۳۰	۰٫۲۵۵۰	۰٫۲۷۲۸	۰٫۲۰۲۰	۰٫۲۱۳۰	۰٫۲۳۴۴	۰٫۰۲۸۷
	Atest-Ac	۰٫۲۳۰۷	۰٫۱۹۳۲	۰٫۲۳۵۱	۰٫۲۵۲۹	۰٫۱۸۲۲	۰٫۱۹۳۲	۰٫۲۱۴۶	۰٫۰۲۸۷
	SWCNTs µg/well	۳٫۰۰۸	۲٫۵۱۹۰	۳٫۰۶۵۲	۳٫۲۹۷۳	۲٫۳۷۵۵	۲٫۵۱۸۹	۲٫۷۹۷۹	۰٫۳۷۴۲
	SWCNTs pg/cell	۵٫۰۵۵	۴٫۲۳۳۶	۵٫۱۵۱۵	۵٫۵۴۱۶	۳٫۹۹۲۴	۴٫۲۳۳۴	۴٫۷۰۲۳	۰٫۰۶۲۸۹

SD : انحراف معیار.

Ac : جذبایی در ۷۵۰ nm برای لیزات سلولی به‌دست‌آمده از گروه‌های کنترل.

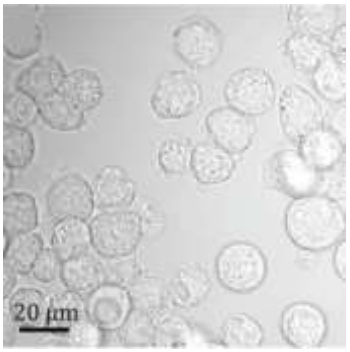
Atest : جذبایی لیزات سلولی در ۷۵۰ nm به‌دست‌آمده از گروه‌های آزمون SWCNTs.

SWCNTs (µg/well) : مقدار تخمینی SWCNTs در هر چاهک براساس خط کالیبراسیون (به شکل الف-۱ مراجعه شود) و جذبایی.

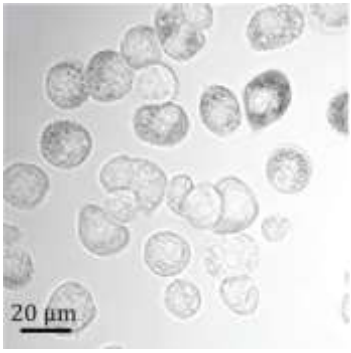
SWCNTs (pg/cell) : مقدار SWCNTs برحسب µg/well تقسیم بر تعداد سلول‌ها به‌دست‌آمده از زیربند الف-۳-۲-۱.

الف- ۴ مشاهدهٔ برداشت سلولی SWCNTs با RAW 264.7

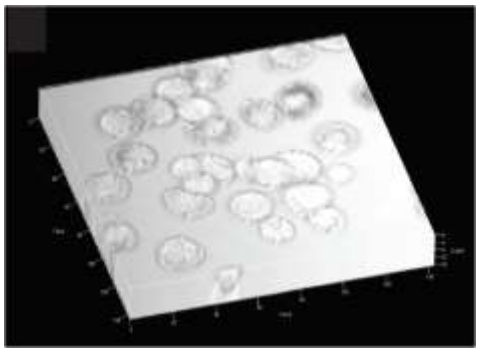
برای حصول اطمینان از این که فرایند شستشو با PBS در زیربند ۶-۷ برای خارج کردن CNTs از سلول‌ها کافی است، سلول‌های RAW 264.7 پس از برداشت SWCNTs و شستشو با PBS پیش از لیز سلولی، با میکروسکوپی نوری مشاهده شدند. نتایج نشان دادند که تحت شرایط این آزمون، SWCNTs درون سلول‌ها وجود دارند (به شکل الف-۴ مراجعه شود).



الف- سلول‌های RAW 264.7 به‌عنوان کنترل



ب- تصویر مستخرج از پ سلول‌های RAW 264.7 پس از گرم‌خانه‌گذاری با پراکنهٔ SWCNTs و شستشو با PBS



پ- بازسازی سه بعدی ۱۰ تصویر Z-stack از سلول‌های RAW 264.7 پس از گرم‌خانه‌گذاری با پراکنهٔ SWCNTs و شستشو با PBS

یادآوری- لکه‌های سیاه روی سلول‌ها در تصاویر شکل‌های **الف-۴**، **ب** و **پ** برداشت سلولی SWCNTs را نشان می‌دهند. خط مقیاس: µm ۲۰

شکل الف-۴- تصاویر میکروسکوپی هم‌کانون سلول‌های RAW 264.7 و سلول‌های RAW 264.7 پس از برداشت SWCNTs

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

مطالعهٔ موردی CNHs

ب-۱ مواد و تجهیزات

ب-۱-۱ مواد

ب-۱-۱-۱ CNHs، نمونهٔ «تازه رشد داده‌شدهٔ»[1] CNH که از شرکت NEC ژاپن تهیه شده‌است. نمونه پیش از استفاده در یک اتوکلاو (دَم‌فشار)[2] در ۱۲۱ °C به‌مدت ۲۰ min سترون شده است.

ب-۱-۱-۲ CNH، تعلیقهٔ آزمون: CNHs تازه رشد داده‌شده با غلظت ۱ mg/ml به‌صورت همگن در محلول BSA پراکنده شده‌اند.

ب-۱-۱-۳ واکنشگر لیز سلولی، CelLytic M (Sigma, C2978).

ب-۱-۱-۴ محلول SDBS، پودر SDBS حل‌شده با غلظت ۵۰ mg/ml در آب خالص یون‌زدوده.

دیگر مواد شیمیایی و واکنشگرها برای کشت سلولی به‌همان صورتی هستند که در این استاندارد توضیح داده شده‌است.

ب-۱-۲ ردهٔ سلولی

ب-۱-۲-۱ RAW 264.7، ماکروفاژ مونوسیت موش؛ مجموعهٔ احراز صلاحیت‌شدهٔ کشت سلولی اروپا، بریتانیا.

ب-۱-۲-۲ خواص کشت، چسبنده.

ب-۱-۳ تجهیزات

ب-۱-۳-۱ همگن‌ساز، همگن‌ساز فراصوت با نوک شیپوری، ضدعفونی‌شده با محلول آبی ٪ ۷۰ اتانول.

ب-۱-۳-۲ طیف‌سنج UV-Vis-NIR.

ب-۱-۳-۳ کووت کوارتز برای اندازه‌گیری جذب، یک کووت کوارتز میکروحجم با طول مسیر ۱۰ mm و حجم ۷۰۰ µl.

تمامی ظروف و آب خالص یون‌زدوده پیش از استفاده در یک اتوکلاو در ۱۲۱ °C به‌مدت ۲۰ min سترون شده‌اند.

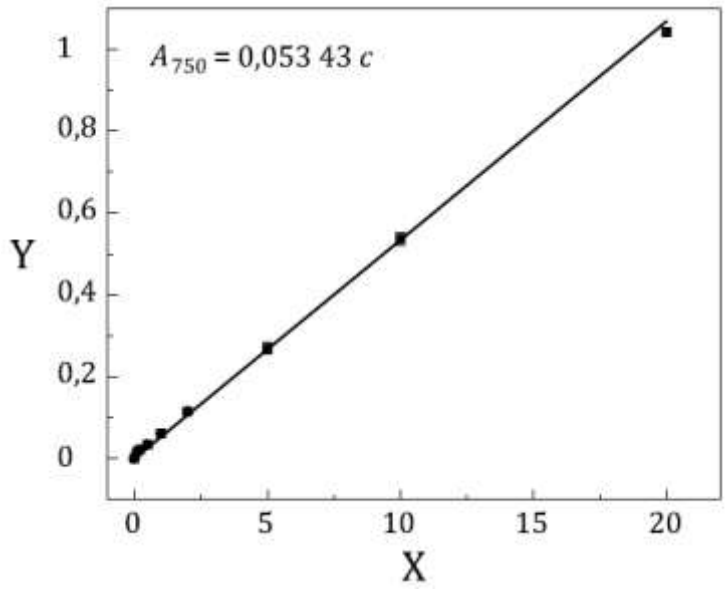
1- As-grown
2- Autoclave

ب-۲ خط کالیبراسیون CNHs در تعلیقهٔ آبی

با رقیق‌سازی تعلیقهٔ آزمون با محلول ترکیبی SDBS و واکنشگر لیز سلولی (۱:۱) پراکنه‌های CNHs با غلظت‌های مختلف ۰ µg/ml، ۰٫۱ µg/ml، ۰٫۲ µg/ml، ۰٫۵ µg/ml، ۱ µg/ml، ۲ µg/ml، ۵ µg/ml، ۱۰ µg/ml و ۲۰ µg/ml آماده شدند. برای هر غلظت سه نمونهٔ موازی از پراکنه‌های رقیق‌شدهٔ CNHs آماده شد. مقادیر جذبایی پراکنه‌های CNHs در کووت در ۷۵۰ nm با استفاده از طیف‌سنج UV-Vis-NIR اندازه‌گیری شده و در جدول ب-۱ ثبت شدند. همان‌گونه که در شکل ب-۱ نشان داده شده، خط کالیبراسیون با رسم مقدار متوسط جذبایی برحسب غلظت آماده شد.

جدول ب-۱ – جذبایی پراکنهٔ CNH در ۷۵۰ nm

	CNHs µg/ml								
	۰	۰٫۱	۰٫۲	۰٫۵	۱	۲	۵	۱۰	۲۰
جذبایی در ۷۵۰ nm	۰٫۰۰۲۲	۰٫۰۱۲۱	۰٫۰۲۲۲	۰٫۰۳۱۶۷	۰٫۰۶۰۴۲	۰٫۱۱۱۱	۰٫۲۵۸۹	۰٫۵۲۲۲	۱٫۰۴۳۲
	-۰٫۰۰۱۷	۰٫۰۱۶۴	۰٫۰۱۹۰	۰٫۰۳۵۸	۰٫۰۶۲۳	۰٫۱۱۹۳	۰٫۲۶۵۰	۰٫۵۳۴۴	۱٫۰۴۱۵
	-۰٫۰۰۰۴	۰٫۰۲۱۲	۰٫۰۲۴۴	۰٫۰۳۶۳	۰٫۰۶۲۱	۰٫۱۱۵۳	۰٫۲۸۴۴	۰٫۵۵۴۵	۱٫۰۴۰۹
میانگین	۰	۰٫۰۱۶۶	۰٫۰۲۱۹	۰٫۰۳۴۶	۰٫۰۶۱۶	۰٫۱۱۵۲	۰٫۲۶۹۴	۰٫۵۳۷۰	۱٫۰۴۱۸۷
SD	۰٫۰۰۲۰	۰٫۰۰۴۶	۰٫۰۰۲۷	۰٫۰۰۲۶	۰٫۰۰۱۰	۰٫۰۰۴۲	۰٫۰۱۳۲	۰٫۰۱۶۳	۰٫۰۰۱۲



راهنما:

X	غلظت (µg/ml)
Y	جذبایی
A_{750}	جذبایی در ۷۵۰ nm
c	غلظت

شکل ب-۱- کالیبراسیون جذبایی پراکنهٔ CNH در ۷۵۰ nm

ب-۳ آزمون برداشت سلولی

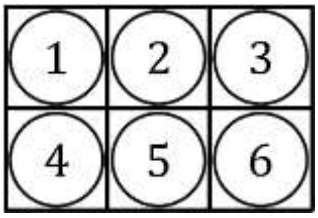
ب-۳-۱ کشت سلولی

سلول‌های RAW 264.7 در محیط RPMI-1640[1] حاوی ٪ ۱۰ FBS و استرپتومایسین/پنی‌سیلین (Gibco) در ۳۷ °C در اتمسفر ٪ ۵ CO_2 کشت شدند.

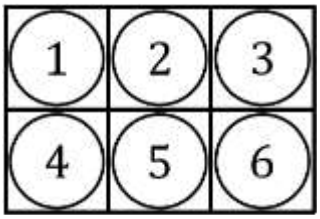
ب-۳-۲ کشت سلولی با پراکنهٔ CNHs

الف- همان‌گونه که در شکل ب-۲ نشان داده شده، از سه پلیت ۶ چاهک برای سه گروه (دو گروه برای کنترل و یکی برای آزمون CNHs)، استفاده می‌شود. پراکنهٔ سلول‌ها (در حدود ml/ $۱٫۱ \times ۱۰^{۵}$ ml ، ۳) در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۶ چاهک کاشته و به‌مدت h ۲۴ گرم‌خانه‌گذاری می‌شود.

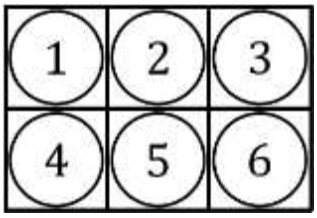
۱- محصول RPMI-1640 مثالی از یک محصول مناسب موجود در بازار است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به منزلهٔ تایید این محصول توسط سازمان ملی استاندارد نیست.



الف- کنترل برای شمارش سلول



ب- کنترل (۶ = *n*)



پ- آزمون CNM (۶ = *n*)

یادآوری- هر پلیت متناظر با یک کنترل برای شمارش سلول یا کنترل برای لیز سلولی یا برای آزمون CNH است.

شکل ب-۲ - طرحواره‌ای از پلیت‌های به‌کاررفته برای کشت سلولی

ب- محیط کشت با پراکنهٔ CNHs (۰٫۰۵ mg/ml در محیط کشت) یا محیط کشت تازه (کنترل) جایگزین می‌شود.

پ- پلیت‌ها را به‌آرامی به گرم‌خانه منتقل و سلول‌ها را به‌مدت ۲۴ h گرم‌خانه‌گذاری کنید.

ب-۳-۳ شمارش سلول

پس از گرم‌خانه‌گذاری توضیح‌داده‌شده در بالا (به زیربند ب-۳-۲ مراجعه شود) تعداد سلول‌های هر چاهک گروه کنترل با یک سلول‌شمار شمارش می‌شود. نتایج در جدول ب-۲ نشان داده شده‌اند.

جدول ب-۲- تعداد سلول‌ها پس از گرم‌خانه‌گذاری

	شمارهٔ چاهک						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط
تعداد سلول‌ها در هر چاهک $\times 10^5$	۵٫۷۱	۶٫۱۵	۵٫۸۴	۵٫۹۴	۶٫۱۳	۵٫۹۶	۵٫۹۵

ب-۳-۴ آماده‌سازی لیزات‌های سلولی

فرایند آماده‌سازی لیزات‌های سلولی مطابق روش اجرایی زیربند ۶-۷-۲ است.

ب-۳-۵ اندازه‌گیری جذبایی لیزات‌های سلولی

اندازه‌گیری مطابق روش اجرایی زیربند ۶-۸ انجام می‌شود.

ب-۳-۶ نتیجهٔ آزمون

نتایج آزمون در جدول ب-۳ نشان داده شده‌اند.

جدول ب-۳- نتایج برداشت سلولی CNH

		شمارهٔ چاهک							
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط (Ac)	SD
کنترل	**Ac**	۰٫۰۲۴۹	۰٫۰۳۲۵	۰٫۰۱۰۳	۰٫۰۱۹۰	۰٫۰۲۵۹	۰٫۰۲۳۷	۰٫۰۲۲۷	۰٫۰۰۷۵
آزمون CNHs	**Atest**	۰٫۱۳۱۳	۰٫۱۴۵۲	۰٫۱۴۱۰	۰٫۱۳۵۹	۰٫۱۴۱۷	۰٫۱۴۰۸	۰٫۱۳۹۳	۰٫۰۰۴۹
	Atest-Ac	۰٫۱۰۸۶	۰٫۱۲۲۵	۰٫۱۱۸۳	۰٫۱۱۳۲	۰٫۱۱۹۰	۰٫۱۱۸۱	۰٫۱۱۶۶	۰٫۰۰۵۴
	CNHs µg/well	۲٫۰۳۲۶	۲٫۲۹۲۷	۲٫۲۱۴۱	۲٫۱۱۸۷	۲٫۲۲۷۲	۲٫۲۱۰۴	۲٫۱۸۲۶	۰٫۰۹۲۲
	CNHs pg/cell	۳٫۴۱۰۳	۳٫۸۴۶۸	۳٫۷۱۴۹	۳٫۵۵۴۸	۳٫۷۳۶۹	۳٫۷۰۸۷	۳٫۶۶۲۱	۰٫۱۵۴۷

SD : انحراف معیار.

Ac : جذبایی در ۷۵۰ nm برای لیزات سلولی به‌دست‌آمده از گروه‌های کنترل.

Atest : جذبایی لیزات سلولی در ۷۵۰ nm به‌دست‌آمده از آزمون‌های CNH.

CNHs (µg/well) : مقدار تخمینی CNHs در هر چاهک براساس خط کالیبراسیون (به زیربند ب-۲ مراجعه شود) و جذبایی.

CNHs (pg/cell) : مقدار CNHs برحسب µg/well تقسیم بر تعداد سلول‌ها به‌دست‌آمده از زیربند ب-۳-۳.

پیوست پ

(آگاهی‌دهنده)

مطالعهٔ موردی MWCNTs

پ-۱ مواد و تجهیزات

پ-۱-۱ مواد[1]

پ-۱-۱-۱ CNTs، نمونهٔ تازه رشد داده‌شدهٔ MWCNT (NC7000) از شرکت نانوسیل[2] (بلژیک) خریداری شده‌است. نمونه پیش از استفاده در یک اتوکلاو در ۱۲۱ °C به‌مدت ۲۰ min سترون شده‌است.

پ-۱-۱-۲ تعلیقهٔ آزمون CNTs، MWCNTs تازه رشد داده‌شده با غلظت ۱ mg/ml به‌صورت همگن در محلول BSA پراکنده شده‌اند.

پ-۱-۱-۳ واکنشگر لیز سلولی، CelLytic M (Sigma, C2978).

پ-۱-۱-۴ محلول SDBS، پودر SDBS که با غلظت ۵۰ mg/ml مستقیماً در آب خالص یون‌زدوده حل شده‌است.

پ-۱-۱-۵ سایر مواد و واکنشگرها برای کشت سلولی، PBS دولبکو[3]، تریپسین-EDTA (۰٫۲۵ ٪)، محیط کشت RPMI-1640 (Invitrogen)، FBS: سرم جنین گاوی (Gibco)، استرپتومایسین/پنی‌سیلین (Sigma-Aldirich).

پ-۱-۲ ردهٔ سلولی

پ-۱-۲-۱ RAW 264.7، ماکروفاژ مونوسیت موش؛ مجموعهٔ احراز صلاحیت‌شدهٔ کشت سلولی اروپا، بریتانیا.

پ-۱-۲-۲ خواص کشت، چسبنده.

پ-۱-۳ تجهیزات

پ-۱-۳-۱ همگن‌ساز، همگن‌ساز فراصوت با نوک شیپوری، ضدعفونی‌شده با محلول آبی ٪ ۷۰ اتانول.

پ-۱-۳-۲ طیف‌سنج UV-Vis-NIR.

۱- موارد ذکر شده در این زیربند مثالی از محصولات مناسب موجود در بازار است. این اطلاعات برای راحتی کاربران این استاندارد ارائه شده و به منزلهٔ تایید این محصولات توسط سازمان ملی استاندارد ایران نیست.

2- Nanocyl
3- Dulbecco

پ-۱-۳-۳ کووت کوارتز برای اندازه‌گیری جذب، یک کووت کوارتز میکروحجم با طول مسیر ۱۰ mm و حجم ۷۰۰ µl.

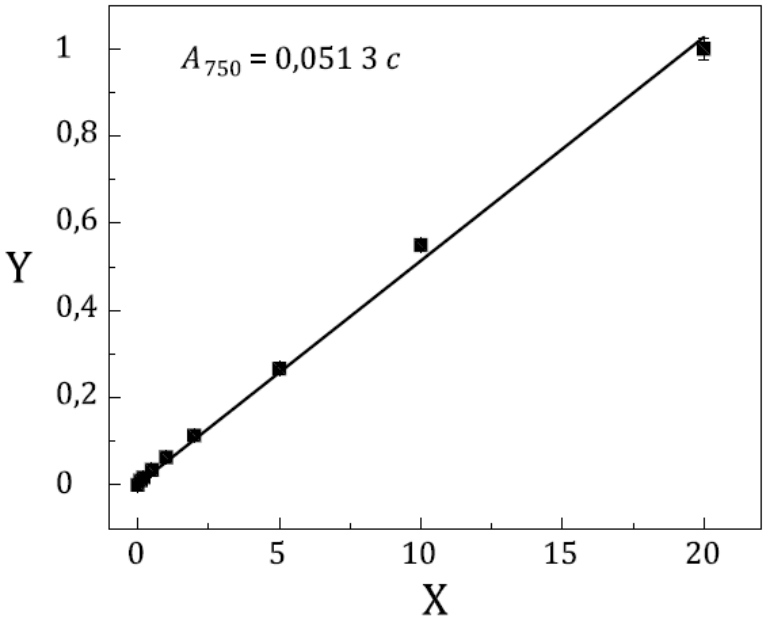
تمامی ظروف و آب خالص یون‌زدوده پیش از استفاده در یک اتوکلاو در ۱۲۱ °C به‌مدت ۲۰ min سترون شده‌اند.

پ-۲ خط کالیبراسیون MWCNTs در تعلیقهٔ آبی

با رقیق‌سازی تعلیقهٔ آزمون با محلول ترکیبی SDBS و واکنشگر لیز سلولی (۱:۱) پراکنه‌های MWCNTs با غلظت‌های مختلف ۰ µg/ml، ۰٫۱ µg/ml، ۰٫۲ µg/ml، ۰٫۵ µg/ml، ۱ µg/ml، ۲ µg/ml، ۵ µg/ml، ۱۰ µg/ml و ۲۰ µg/ml آماده شدند. برای هر غلظت سه نمونهٔ موازی از پراکنه‌های رقیق‌شدهٔ MWCNTs تهیه شدند. مقادیر جذبایی پراکنه‌های MWCNTs در کووت در ۷۵۰ nm با استفاده از طیف‌سنج UV-Vis-NIR اندازه‌گیری شده و در جدول پ-۱ ثبت شدند. همان‌گونه که در شکل پ-۱ نشان داده شده، خط کالیبراسیون با رسم مقدار متوسط جذبایی برحسب غلظت آماده شد.

جدول پ-۱- جذبایی پراکنهٔ MWCNT در ۷۵۰ nm به ازای غلظت‌های مختلف

	MWCNTs µg/ml								
	۰	۰٫۱	۰٫۲	۰٫۵	۱	۲	۵	۱۰	۲۰
جذبایی در ۷۵۰ nm	۰٫۰۰۰۶	۰٫۰۱۰۱	۰٫۰۱۴۲	۰٫۰۳۵۸	۰٫۰۵۳۴	۰٫۱۰۷۲	۰٫۲۷۰۱	۰٫۵۵۸۱	۱٫۰۰۳
	۰٫۰۰۰۷	۰٫۰۰۶۵	۰٫۰۲۰۲	۰٫۰۴۲۸	۰٫۰۶۲۲	۰٫۱۱۳۸	۰٫۲۶۱۸	۰٫۵۴۶۷	۱٫۰۰۲
	-۰٫۰۰۰۵	۰٫۰۱۳۷	۰٫۰۱۶۹	۰٫۰۲۵۴	۰٫۰۷۴۹	۰٫۱۱۸۷	۰٫۲۶۷۴	۰٫۵۴۵۹	۰٫۹۹۸
میانگین	۰٫۰۰۰۳	۰٫۰۱۰۱	۰٫۰۱۷۱	۰٫۰۳۴۷	۰٫۰۶۳۵	۰٫۱۱۳۲	۰٫۲۶۶۴	۰٫۵۵۰۲	۱٫۰۰۱
SD	۰٫۰۰۰۷	۰٫۰۰۳۶	۰٫۰۰۳۰۰	۰٫۰۰۸۸	۰٫۰۱۰۸	۰٫۰۰۵۸	۰٫۰۰۴۲	۰٫۰۰۶۸	۰٫۰۲۶۵



راهنما:

X	غلظت (µg/ml)
Y	جذبایی
A_{750}	جذبایی در ۷۵۰ nm
c	غلظت

شکل پ-۱- کالیبراسیون جذبایی پراکنهٔ MWCNT در ۷۵۰ nm

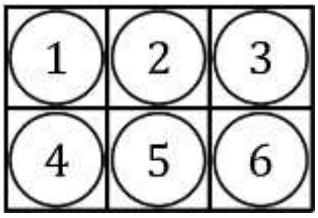
پ-۳ آزمون برداشت سلولی

پ-۳-۱ کشت سلولی

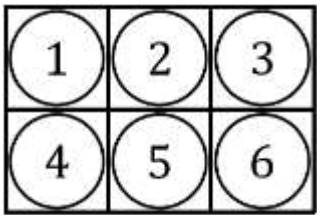
سلول‌های RAW 264.7 در محیط RPMI-1640 حاوی FBS ٪ ۱۰ و استرپتومایسین/پنی‌سیلین (Gibco) در ۳۷ °C در اتمسفر ٪ ۵ CO_2 کشت شدند.

پ-۳-۲ کشت سلولی با پراکنهٔ CNTs

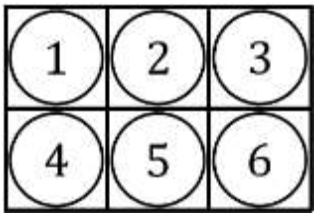
الف- همان‌گونه که در شکل پ-۲ نشان داده شده، از سه پلیت ۶ چاهک برای سه گروه (دو گروه برای کنترل و یکی برای آزمون MWCNTs)، استفاده می‌شود. پراکنهٔ سلول‌ها (در حدود ml/ $۱۰^{۵}$ × ۲٫۵۴ ، ml ۳) در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۶ چاهک کاشته و به‌مدت h ۲۴ گرم‌خانه‌گذاری می‌شود.



الف- کنترل (برای شمارش سلول)



ب- کنترل (n = ۶)



پ- آزمون CNT (n = ۶)

یادآوری- هر پلیت متناظر با یک کنترل برای شمارش سلول یا کنترل برای لیز سلولی یا برای آزمون CNT است.

شکل پ-۲ - طرحواره‌ای از پلیت‌های به‌کاررفته برای کشت سلولی

ب- محیط کشت با پراکنهٔ MWCNTs (۰٫۰۵ mg/ml در محیط کشت) یا محیط کشت تازه (کنترل) جایگزین می‌شود.

پ- پلیت‌ها را به‌آرامی به گرم‌خانه منتقل و سلول‌ها را به‌مدت ۲۴ h گرم‌خانه‌گذاری کنید.

پ-۳-۳ شمارش سلول

پس از گرم‌خانه‌گذاری توضیح‌داده‌شده در بالا (به زیربند پ-۳-۲ مراجعه شود) تعداد سلول‌های هر چاهک گروه کنترل شمارش با یک سلول‌شمار شمارش می‌شود. نتایج در جدول پ-۲ نشان داده شده‌اند.

جدول پ-۲- تعداد سلول‌ها پس از گرم‌خانه‌گذاری

	شمارهٔ چاهک						
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط
تعداد سلول‌ها در هر چاهک $\times 10^5$	۸٫۳۳	۹٫۷۳	۹٫۰۵	۱۰٫۶	۸٫۶۵	۹٫۱۰	۹٫۲

پ-۳-۴ آماده‌سازی لیزات‌های سلولی

فرایند آماده‌سازی لیزات‌های سلولی مطابق روش اجرایی زیربند ۶-۷-۲ است.

پ-۳-۵ اندازه‌گیری جذبایی لیزات‌های سلولی

اندازه‌گیری مطابق روش اجرایی زیربند ۶-۸ انجام می‌شود.

پ-۳-۶ نتیجهٔ آزمون

نتایج در جدول پ-۳ نشان داده شده‌اند.

جدول پ-۳- نتایج برداشت سلولی MWCNTs

		شمارهٔ چاهک							
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	متوسط (Ac)	SD
کنترل	Ac	۰٫۰۱۸۳	۰٫۰۲۱۹	۰٫۰۲۰۵	۰٫۰۱۹۳	۰٫۰۲۰۴	۰٫۰۲۱۰	۰٫۰۲۰۲	۰٫۰۰۱۳
آزمون CNTs	Atest	۰٫۴۶۸۹	۰٫۴۶۰۰	۰٫۵۲۴۲	۰٫۴۳۹۰	۰٫۴۴۵۸	۰٫۴۲۹۶	۰٫۴۶۱۲	۰٫۰۳۳۹
	Atest-Ac	۰٫۴۴۸۷	۰٫۴۳۹۸	۰٫۵۰۴۰	۰٫۴۱۸۸	۰٫۴۲۵۶	۰٫۴۰۹۴	۰٫۴۴۱۰	۰٫۰۳۳۹
	CNTs µg/well	۸٫۷۴۶۶	۸٫۵۷۳۱	۹٫۸۲۴۶	۸٫۱۶۳۷	۸٫۲۹۶۳	۷٫۹۸۰۵	۸٫۵۹۷۵	۰٫۶۶۱۵
	CNTs pg/cell	۹٫۵۰۷۲	۹٫۳۱۸۶	۱۰٫۷۸۸۷	۸٫۸۷۳۶	۹٫۰۱۷۷	۸٫۶۷۴۵	۹٫۳۴۵۱	۰٫۷۱۹۰

SD : انحراف معیار.

Ac : جذبایی در ۷۵۰ nm برای لیزات سلولی به‌دست‌آمده از گروه‌های کنترل.

Atest : جذبایی لیزات سلولی در ۷۵۰ nm به‌دست‌آمده از گروه‌های آزمون MWCNTs.

CNTs (µg/well) : مقدار تخمینی MWCNTs در هر چاهک براساس خط کالیبراسیون (به زیربند پ-۲ مراجعه شود) و جذبایی.

CNTs (pg/cell) : مقدار CNTs برحسب µg/well تقسیم بر تعداد سلول‌ها به‌دست‌آمده از زیربند پ-۳-۳.

کتاب‌نامه

[1] Salzmann C. G., Chu B. T. T., Tobias G., Llewellyn S. A., Green M. L. H., Quantitative Assessment of Carbon Nanotube Dispersions by Raman Spectroscopy, Carbon, 2007, **45**, 907-912.

[2] Heller D. A., Baik S., Eurell T. e., Strano M. S., Single-Walled Carbon Nanotube Spectroscopy in live Cells: Towards Long-term Labels and Optical Sensors, Adv. Mater. 2005, **17**, 2793-2799.

[3] Holt B. D., Noel Dahl K., Islam M. F., Quantification of Uptake and Localization of Bovine Serum Albumin-Stabilized Single-Wall Carbon Nanotubes in Different Human Cell Types, Small 2011, **7**, 2348-2355.

[4] Hirano S., Fujitani Y., Furuyama A., Kanno S., Uptake and Cytotoxic Effects of Multi-Walled Carbon Nanotubes in Human Bronchial Epithelial Cells, Toxicology and Applied Pharmacology 2010, **249**, 8-15. 8-15.

[5] Zhang M., Zhou X., Iijima S., Yudasaka M., Small-Sized Carbon Nanohorns Enabling Cellular Uptake, Small 2012, **8**, 2524-2531.

[6] Zhang T., Tang M., Kong L., Li H., Zhang T., Zhang S., Xue Y., Pu Y., Comparison of Cytotoxic and Inflammatory Responses of Pristine and Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes in RAW 264.7 Mouse Macrophages, Journal of Hazardous Materials 2012, **219**, 203-212.

[7] Yang M., Zhang M., Tahara Y., Chechetka S., Miyako E., Iijima S., Yudasaka M., Lysosomal Membrane Permeabilization: Carbon Nanohorn-Induced Reactive Oxygen Species Generation and Toxicity by This Neglected Mechanism, Toxicology and Applied Pharmacology 2014, **280**, 117-126.

[8] Zhang M., Yang M., Bussy C., Iijima S., Kostarelos K., Yudasaka M., Biodegradation of Carbon Nanohorns in Macrophage Cells, Nanoscale 2015, **7**, 2834-2840.

[9] ISO/TS 10868, Nanotechnologies – Characterization of single-wall carbon nanotubes using ultraviolet-visible-near infrared (UV-Vis-NIR) absorption spectroscopy.

[10] Kataura H., Kumazawa Y., Maniwa Y., Umezu I., Suzuki S., Ohtsuka Y., Achiba Y., Optical Properties of Single-Wall Carbon Nanotubes, Synthetic metals 1999, **103**, 2555-2558.

[11] Weissleder R., A Clearer Vision for in Vivo Imaging, Nature biotechnology, 2001, **19**, 316-317.

[12] Coecke S., Balls M., Davis J. C., Straunthaler G., Hartung T., Guidance on Good Cell Culture Practice, A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Altern Lab Anim. 2005, **33**, 261-287.

[13] Freshney R. I., Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique, 3rd ed., New York: wiley-Liss (1993).

[14] Zhang M., Yang M., Morimoto T., Tajima N., Ichiraku K., Fujita K., Iijima S., Yudasaka M., Okazaki T., size-dependent Cell Uptake of Carbon Nanotubes by macrophages: A Comparative and Quantitative Study, Carbon 2018, **127**, 93-101.

[۱۵] استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۳۱۰۸: سال ۱۴۰۰، فناوری نانو- سنجش برون‌تنی MTS برای اندازه‌گیری اثر سمیت سلولی نانوذرات

[۱۶] استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۹۹۵۹: سال ۱۳۹۷، بیوتکنولوژی- شمارش سلول- قسمت ۱: راهنمای کلی روش‌های شمارش سلول.

[17] Fujita K., Endoh S., Maru J. et al., Sample preparation and characterization for safety testing of carbon nanotubes, and in vitro cell-based assay. (2014) Available from: https://en.aist-riss.jp/assessment/

[18] ISO/TS 19337, Nanotechnologies – Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity.

یادآوری- استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۲۱۱۴۴: سال ۱۳۹۵، فناوری نانو – مشخصه‌های سوسپانسیون‌های کاری نانواشیاء برای سنجش برون‌تن به‌منظور ارزیابی سمیت ذاتی نانوشیء، با استفاده از استاندارد ISO/TS 19377: 2016 تدوین شده است.