بسمه تعالي

مقررات ايمني زيستي

در آزمايشگاههای گروه زيست شناسي

دانشکده علوم

دانشگاه اصفهان

تهيه و تنظيم:

دکتر حميد زرکش

دانشگاه اصفهان

اولین وظیفه هر شخص رعایت نکات ایمنی است به طوری که کار کردن فرد برای خود وبرای دیگران ایجاد خطر ننمایدبرای اطمینان از اطلاع شما نسبت به موارد ایمنی برشور ایمنی و کار در آزمایشگاه در اختیار شما قرار گرفته و امتحاني در این مورد به عمل مي آید.

مقررات و اصول کار در آزمایشگاه

اجرای نکات زیر برای تمام افراد شامل دانشجویان-تکنسینها- کارشناسان و مربیان و کلیه پژوهشگران اجباری ودر صورت مشاهده تمردازنکات ایمنی زیر از فعالیت آن فرد در آزمایشگاه جلوگیری میشود.

- درهنگام حضور در آزمایشگاه حتما" از روپوش آزمایشگاه استفاده کنید و دگمه‌های آن کاملا بسته شود.استفاده از ماسک و دستکش لاتکس الزامی است
- از خوردن ، نوشیدن ، سیگار کشیدن و...در محیط آزمایشگاه جدا" پرهیز نمایید.
- حتی الامکان، از کفشهای جلوبسته در آزمایشگاه استفاده شود.
- خانمها مي بایستي مقنعه یا روسری خود را داخل روپوش قرار دهند در غیر اینصورت از مقنعه جداگانه برای آزمایشگاه استفاده نمایند.
- از همراه داشتن کیف و وسایل شخصي در محیط آزمایشگاه جدا" پرهیز نمایید.
- کلیه افراد در آزمایشگاه موظف به رعایت اصول ایمني مي باشند.
- همواره کارت دانشجوییکارت شناسایي یا مجوز کار خود را همراه داشته باشید و کارتهای شناسایي تهیه شده را به سمت چپ روپوش خود الصاق نمایید به نحوی که اطلاعات آن قابل رویت باشد.
- قبل از استفاده از دستگاه اطمینان حاصل نمایید که دستگاه در شرایط مناسب و تمیز نگهداری شده در غیر اینصورت آن را به مسئول آزمایشگاه گزارش دهید.
- پس از استفاده از دستگاه و محیط آزمایشگاه آنها را تمیز وآماده استفاده برای نفر بعد نمایید.

- ساعت معمول کار در آزمایشگاهها از ۷ صبح لغایت ۱۶ مي باشد. چنانچه لازم باشد که فردی بیش از این ساعت در آزمایشگاه حضور داشته باشد ضروری است برنامه کار و علت حضور خود را مشخص نماید و قبلا" با مجری طرح ، مسئول آزمایشگاه هماهنگی لازم را بعمل آورد تا طی یک نامه از مدیر گروه به ریاست دانشکده و حراست مجوزهای لازم دریافت گردد.
- جهت استفاده از هر دستگاه و به منظور جلوگیری از هرگونه اختلال در دستگاهها لازماست در شروع استفاده ضمن مراجعه به کارشناس آزمایشگاه و دریافت فرم مربوطه بامسئول دستگاه(اعضا هیات علمی) هماهنگي کامل بعمل آید.
- برای هر بار استفاده از دستگاه حتما" فرم Log Book(فرم مخصوص) را تکمیل و در صورت لزوم از قبل رزرو نمایید.
- مطالعه MSDS تمامي مواد مطالعه و مورد توجه واقع شود.
- هنگام استفاده از ترازو و بعد از هرتوزین صفحه ترازو و قاشقک مخصوص توزین را به دقت تمیز نمایید.
- پیش از توزین یا برداشتن هر ماده برچسب ایمني آن را مطالعه کنید.
- پس از توزین لازماست مواد شیمیایي به انبار یا محل اصلي خود برگردانده شود.
- در برداشت از Stock اصلي دقت فرمائید تا آنها آلوده نشوند و در صورت آلودگي حتما" به مسئول مربوطه اطلاع داده شود.
- در استفاده از مواد شیمیایي خطرناک و نیز مواد آلوده کمال دقت را به عمل آورید و همواره اصول ایمني را رعایت نمایید.

- ظروف Stock مواد شیمیایي و محلول هایي مانند، اسید، الکل، فنل و مواد شیمیایي جامد را برروی میز کار خود قرار ندهید.
- هرگز مواد شیمیایي محلول را بوسیله پیپت با دهان نکشید.
- سوزن و اجسام برنده را در ظروف مخصوص (safety box)ریخته و در صورت آلودگي سوزن و سرنگ ها باید آلودگي زدایي (ترجیحا" با اتوکلاو) گردد.
- نمام مواد و وسایل مورد استفاده در صورت احتمال آلودگي بایستي اتوکلاو گردند و مسئولیت نتقال آنها پس از شستشو به اتاق اتوکلاو به عهدهٔ استفاده کننده مي باشد.
- ز ریختن محلولهای آلوده به DNA به فاضلاب جداً خوداری نمایید و چنانچه به اشتباه محلولهای آلوده به DNA در سینک های ظرفشویي ریخته شد (که در صورت دقت لازم احتمال آن بسیاراندک است)، ضروری است با بازکردن آب از سینک به طور کامل شستشو شود.
- ظروف (تمیز یک بار مصرف) آلوده به DNA را با وایتکس یا اسید رقیق شستشو دهید.
- در صورت استفاه ازنمونه های خون، بهتر است افراد واکسینه گردند.
- ظروف آلوده به خون نباید دوباره استفاده شوند مگر کاملا" ضد عفوني گردند.
- در صورت آلوده شدن میزهای آزمایشگاه توسط خون، میز یا محل آلوده با ماده ضد عفوني کننده مانند آب ژاول ۱۰% ، سود ۰/۵ مولارو یا SDS ۰/۵% ضد عفوني شده سپس با آب شستشوگردد.
- نمونه های آلوده اتوکلاو گردند.
- هنگام استفاده از میکروپیپت برای برداشتن مواد محلول، کاملا" دقت کنید تا فقط نوک پیپت با آنها تماس یابد. مایع نباید وارد میکروپیپت شود.
- از کشیدن مواد خورنده مانند اسید و باز قوی با میکروپیپت خودداری نمایید.

- انبار کردن و نگهداری رسایل غیر ضروری در زیر هودها ممنوع مي باشد.
- درصورت استفاده از هود، برای جلوگیری ز ایجاد اختلال در جریانات هوایي ز جمع نمودن رسایل در زیر هود به ویژه محلهای ورودی ر خروجي هوا جدا" خودداری نمایید.
- مواد شیمیایي فرار و موادی که بخارات سمي دارند حتما" در زیر هود شیمیایي(نه هود لامینار) باز گردند.
- ژل های آگارز محتوی اتیدیوم برماید را جهت رویت نوار بوسیله لامپ UV؛ حتما" داخل ظرف انتقال دهید و از تماس دست بدون دستکش به آنها جدا" خود داری فرمائید.
- هنگام کار با دستگاه UV از عینک محافظ و دستکش استفاده نمایید.
- دقت کامل به عمل آورید تا با دستکش آلوده به اتیدیوم برماید به دستگیره درها، کلید های برق، کلید دستگاهها، تلفن، خود کار یا ماژیک دست نزنید.
- ظروف مورد استفاده خود را پس از اتمام کار شستشو و در فور خشک کنید. رچنانچه نیاز به آلودگي زدایي دارد، حتما" پیش از شستشو این کار را انجام دهید.
- پس از اتمام کار محل کار خود را تمیز و ضد عفوني نمایید.
- هنگام ترک آزمایشگاه از خاموش بودن دستگاه ، **بستن شیر گاز و آب**... اطمینان کامل حاصل نمایید.
- پاکسازی منظم، بنیادی و دوره ای (ماهي یکبار) در محیط آزمایشگاه باید انجام گیرد و مشارکت همه افرادی که در آزمایشگاه مشغول به کار هستند، الزامي ست.
- در صورت مشاهدهٔ خرابي و اختلال در دستگاهها ضروری است هر چه سریعتر به مسئول وقت دستگاهها اطلاع داده شود.

- در صورت مشاهده تخلف از مقررات فوق در مرحله اول تذکر کتبي توسط مدير محترم گروه و در صورت تکرار، مراتب در شورای گروه مطرح و برابر مصوبات شورا و مقررات برخورد قانوني صورت خواهد گرفت.
- دقت کامل به عمل آوريد تا از گذاشتن لوله ها و ظروف حاوی مواد بدون برچسب در يخچالها و فريزرها و قفسه ها، جدا" خودداری شود.
- از گذاشتن لوله ها و ظروف حاوی مواد غير از قسمتهای مشخص شده در يخچالها و فريزرها نيز جدا" پرهيز شود.
- تمام آنزيمها و موادی که ضرورت دارد در$-20^{\circ}c$ نگهداری شوند نبايد برای مدت طولاني برروی ميز کار گذاشته شود و ضروری است به سرعت به فريزر برگشت داده شود و در زمان استفاده نيز در روی يخ قرار داده شوند .
- از نگهداری مقادير زياد لوله ، سرسمپلر و مانند آن در کمدها جدا" خودداری شود.
- طرحهای تحقيقاتي که در آزمايشگاههای گروه انجام مي شود و همکاران طرحهای تحقيقاتي بايد مشخص باشندو نام همکاران در محل ورودی آزمايشگاهها نصب گردد.
- تمامي افرادی که در آزمايشگاه مشغول به کار مي شوند (همکار طرح- دانشجو) بايد از مقررات سطح ايمني II آگاهي داشته و آنها را رعايت نمايند.
- ورود هر فرد جديد به آزمايشگاه (همکار طرح- دانشجو) منوط به معرفي کتبي به مدير گروه و مسئول ايمني و مسئول نظارت برآزمايشگاهها و گذراندن کلاسهای ايمني زيستي(biosafety) که در گروه تشکيل خواهد شد مي باشند.

- بسته به نوع کار پژوهش ، چنانچه علاوه بر مقررات ایمني زيستي II، آموزش های دیگری نیاز است مجری طرح پژوهشي موظف به آموزش نکات اختصاصي کار به فرد مورد نظر مي باشد.
- در صورت وقوع آتش سوزی،برق گرفتگي و هر گونه اتفاق نا گوار دیگر مراتب را سریعا به نتضامات دانشگاه(تلفن ۲۴۹۵) طلاع دهید.
- هر گونه پیشنهاد،انتقاد و یا هر مورد دیگر را با کارشناس آزمایشگاه و تلفن ۲۴۶۳ در میان بگذارید.

با تشکر

کمیته ایمنی آزمایشگاه‌های پژوهشی گروه زیست شناسی

اصطلاحات و تعاریف آن ها:

اصطلاح	تعریف
آئروسل (aerosols)	کلوئیدی از ذرات مایع یا جامد کوچکتر از ۱۰ میکرون معلق در گاز
اتوکلاو (autoclave)	وسیله ای که به منظور استریلیزاسیون وسایل یا ضایعات بیولوژیک با استفاده از حرارت بخار آب و فشار در یک مخزن یا تانک طراحی شده است.
عوامل بیولوژیک (biological agents)	به عوامل آلوده کننده و مولکولهای DNA نوترکیب گفته می شود.
عوامل پرخطر بیولوژیک (biohazardous-agent)	یک عامل پاتوژن که قادر به همانند سازی و تولید بیماری در انسان ، حیوان یا گیاه باشد.
زباله های بیولوژیک (biological waste)	زباله های آزمایشگاهی شامل موارد زیر می باشد: ۱.نمونه های کشت انسان یا حیوان در آزمایشگاهای تشخیص طبی ۲.محیط های کشت یا ذخائر عوامل آلوده کننده در آزمایشگاهای تحقیقاتی و صنعتی ۳.زباله های حاصل شده از باکتری ها،ویروس ها،اسپورها،عوامل زنده ی دور انداخته شده و واکسنهای زنده یا ضعیف شده که برای تحقیقات یا انسان ها به کار گرفته شده اند،واکسن های دور انداخته شده ی حیوانی شامل بروسلوز و اگزمای مسری و ظروف محیط کشت و وسایلی که در انتقال و تلقیح و محیط های کشت مخلوط مورد استفاده قرار می گیرند.
موانع بیولوژیک (biological barrier)	یک مانع(که به طور طبیعی اتفاق می افتد) بر سر راه عفونت و بقای عوامل پر خطر بیولوژیک
هود ایمن بیولوژیک (biological safety cabinet)	وسیله ای که از سه طرف و بالا و پایین محصور شده است و به منظور تهویه ی هوا از سیستمی در آن استفاده شده است. این وسیله طوری طراحی شذه است.که فقط دست ها و بازوها در آن قرار می گیرد.

سطوح ایمنی زیستی (biosafety level)	آزمایشات،تکنیک ها،ایمنی وسایل و راحتی کار در آزمایشگاه موسسه ی ملی سلامتی(NIH) و مرکز کنترل بیماری(CDC) چهار سطح را درایمنی زیستی و چهار سطح را در ایمنی زیستی حیوانات
پاتوژن های خون (bloodborne pathogen)	میکروارگانیسم هایی که در خون انسان و دیگر نخستین ها حضور دارند و می توانند در انسان ها ایجاد بیماری کنند.این پاتوژن ها شامل(ولی نه محدود به) ویروس هپاتیت B و ویروس HIV می باشند.
سد نفوذ (containment)	حبس کردن عوامل پرخطر بیولوژیک که کشت یا ذخیره یا به کار برده یا منتقل یا تخریب شده اند به منظور جلوگیری یا محدود کردن تماس مردم و محیط زیست با آن ها
آزمایشگاه تشخیص طبی (clinical laboratory)	آزمایشگاهی که روش های تشخیصی و آنالیزهای کامپیوتری روی خون و دیگر مواد آلوده انجام می گیرد.
رفع آلودگی (decontainment)	حذف یا خنثی کردن عوامل سمی و یا استفاده از عوامل فیزیکی و شیمیایی برای حذف یا غیر فعال کردن یا تخریب ارگانیسم های زنده روی یک سطح یا شیء به شرطی که ارگانیسم ها توانایی پخش طولانی مدت ذرات آلودگی را نداشته باشند و سطح یا شیء برای استفاده با دست ایمن باشد.
نمونه های تشخیصی (diagnostic specimen)	هر نوع ماده ای از انسان یا حیوان شامل(ولی نه محدود به)مدفوع،ادرار،خون و اجزای تشکیل دهنده ی آن و بافت و مایعات بافتی که به منظور تشخیص آنالیز می شوند.
ضدعفوني (disinfection)	فرایندی که از طریق آن عوامل پرخطر بیولوژیک کاهش می یابند و به سطحی می رسند که دیگر قادر به ایجاد بیماری در انسان،حیوان و گیاه نیستند.
کنترل های مهندسی (engineering controls)	کنترل هایی مثل محافظ برای اشیاء تیز و سوزن های غلاف دار که احتمال وقوع پیشامد را از محل کار حذف می کنند.
تماس درمعرض (exposure)	تماس با خون یا دیگر آلوده کننده های بالقوه که نتیجه ی عملکرد نادرست مستخدم آزمایشگاه می باشد.

(incident	
فیلتر HEPA (HEPA filter)	فیلتر هوا با کارایی بالا. یک محیط چین دار گسترده ی مستعد و با فیلتر نوع خشک با که باعث محصور شدن عمیق چینه ها می شود و حذف ذرات بسیار کوچک تا ۹۹/۹۷ درصد.
غیرفعال سازی (inactivation)	هر فرایندی که توانایی عوامل پرخطر بیولوژیک را از بین ببرد.
عوامل عفونی (infectious agent)	رگانیسمی(ویروس،ریکتسیا،باکتری،قارچ،پروتوزوا) که قادر است آلودگی یا بیماری تولید کند.
زباله های عفونی (infectious waste)	زباله های جامد حاوی پاتوژن ها با قدرت بیماری زایی کافی و مقدار کافی که در معرض یک انسان یا حیوان مستعد قرار گرفته و منجر به ایجاد بیماری عفونی در آن حیوان یا انسان می شود.
جریان هوای لامینار (laminar airflow)	جریان هوای غیر مستقسم از میان فضای کار که شامل ۱-جریان هوای تلاطم آزاد ۲-جریان غیر مستقیم با تلاطم اندک ۳-جریان هوای انبوه می باشد.
زباله های مخلوط (mixed waste)	زباله هایی که شامل ترکیبی از اجزای پرخطر می باشند مثل زباله هایی که مخلوطی از عوامل پرخطر بیولوژیک ، مواد رادیواکتیو و مواد شیمیایی می باشند.
زباله های دارویی (medical waste)	زباله های دارویی در موارد زیر تعریف می شوند: - عوامل بیولوژیک پرخطر که در زباله های آزمایشگاهی یافت می شوند.مانند نمونه ها یا محیط های کشت میکروبیولوژیک، استوک عوامل بیماریزا، واکسن های زنده یا ضعیف شده، ظروف کشت و وسایلی که :در انتقال وتلقیح و محیط های کشت مخلوط مورد استفاده قرار می گیرند. - خون مایع شامل خون روان، محصولات خون روان و اجزای تشکیل دهنده خونی که مایع باشد - اشیاء تیز شامل سرنگ ها،سوزن ها، تیغ ها،پیپت پاستورهای شکسته،دیگر وسایل شیشه ای شکسته مانند لوله های خون و آمپول ، سوزنهای طب سوزنی،دندانهای سالم و شکسته وسوهان ها - حیوانات آلوده، لاشه ی حیوانات،قسمت های بدن و مواد زیرین که احتمالاً آلوده به

	عوامل آلودگی شناخته شده به عنوان پاتوژن برای انسان ها می باشد. - نمونه های جراحی شامل قسمت های حذف شده با عمل جراحی یا کالبد شکافی از انسان یا حیوان که گمان می رود آلوده به عوامل آلودگی شناخته شده به عنوان عوامل پاتوژن برای انسان ها باشد. - زباله های با توانایی ایجاد بیماری های بسیار مسری آلوده به مدفوع، ترشحات و نرشحات التهابی از انسان یا حیوان
NIH	انجمن ملی سلامت
اداره ی فعالیت های DNA نوترکیب(ORDA)	داره ای که تحت نظارت NIH فعالیت های آزمایشی را در ارتبات با DNA نوترکیب انجام می دهند.
OSHA	امنیت شغلی و سلامتی سرپرستی
دیگر مواد بالقوه آلوده کننده(OPIM)	موادی که به خون انسان اضافه می شوند و قادر هستند پاتوژن های خون را انتقال دهند که شامل: - مایعات بدن انسان: منی، ترشحات واژن، مایعات مغزی، مایعات پرده ی جنب، مایع آمنیونی، بزاق دهان هنگام عملیات دندانپزشکی،مایعات بدن که با خون آلوده شده اند. - هر بافت یا ارگان فیکس شده از یک انسان یا (مرده یا زنده) - محیط های سلولی یا بافتی آلوده به HIV ،محیط های کشت ارگانیسمی و مواد محیط کشت حاوی HIV یا HBV یا دیگر مایعات همچون محیط های کشت سلولی انسان که عدم حضورپاتوژن آن مشخص نشده باشد. - خون، اندام و دیگر بافت ها از حیوانات آزمایشگاهی آلوده به HIV یا HBV
پاتوژن(pathogen)	هر عامل پرخطر بیولوژیک که قادر به تولید بیماری در انسان، حیوان و یا گیاه شود.
تجهیزات حفاظت شخصی(PPE)	لباس یا لوازم مخصوص که توسط محقق یا مستخدم در جهت حفاظت در برابر عوامل پرخطر استفاده می شود.لباس های عمومی مانند یونیفرم ها، تی شرت و بلوز ها نمی توانند عملکرد خوبی برای محافظت در برابر عوامل پرخطر داشته باشند و به عنوان PPE شناخته نمي شوند.

حفاظت شخصي (personal protection)	تکنیک ها و وسایلی که طراحی شده اند برای محافظت و یا کاهش احتمال خطر در کارمندان.
کمیته ی مشورتی DNA نوترکیب(RAC)	کمیته ی مشورتی که سرپرست NIH را در موارد DNA نوترکیب راهنمایی می کند
DNA نوترکیب	با هر دوی موارد زیر تعریف می شود: - ساختار های مولکولی در خارج از سلول های زنده که به وسیله ی اتصال قطعات طبیعی و یا مصنوعی DNA به مولکول های DNA که قادر به تکثیر در سلول های زنده می باشند. - مولکول های DNA که حاصل تکثیر مولکول های شرح داده شده در بالا مي باشند
وسایل تیز(sharps)	وسایل،آلات و قسمت هایی که دارای لبه های برنده یا زاویه دار هستند و قادر به بریدن، سوراخ کردن و پاره کردن می باشند مانند سرنگ ها، شیشه های شکسته، تیغ ها
استریلیزاسیون	استفاده از یک فرایند فیزیکی یا شیمیایی تا همه ی میکروب های زنده حتی ندوسپورهای باکتری های مقاوم به حرارت نیز از بین برود.
احتیاط همگانی (universal precautions)	توجه همگانی به کنترل آلودگی هایی که خون و مایعات مشخص بدن را تحت تاثیر آلوده شدن به وسیله ی HIV ، HBV و دیگر پاتوژن های خون قرار می گیرند.

آزمایشگاهای مختلف را می توان از نظر میزان عوامل خطرناک موجود و کار در آنها به چهار گروه تقسیم نمود:

۱- آزمایشگاه هایی که در آنها با عوامل ناشناخته یا عواملی که حداقل میزان خطر برای افراد و محیط را دارند, کار می شود.

۲- آزمایشگاهایی که در آنها با عوامل نسبتاً خطرناک کار می شود.

۳- آزمایشگاهایی نظیر آزمایشگاهای پزشکی, تشخیصی, آموزشی, تحقیقاتی یا تولیدی که در آنها با عوامل بیماریزای خطرناکی که می توانند مرگبار نیز باشند کار می شود.

٤- آزمایشگاهایی که در آنها با عوامل مرگباری نظیر ویروس های ایدز و هپاتیت کار می شود.

فعالیت در هر یک از این آزمایشگاه ها باید بر طبق مقررات ایمنی زیستی صورت گیرد. رعایت این مقررات ضامن سلامت افراد شاغل در این آزمایشگاهها, محیط زیست و نیز جامعه می باشد. لذا برای هریک از آزمایشگاههای فوق سطحی از مقررات ایمنی زیستی وضع گردیده است که با توجه به حساسیت موجود و در معرض قرار داشتن افراد با عوامل خطرناک تعریف شده اند.

طراحی هر آزمایشگاه از نظر امکانات ایمنی زیستی و نوع مصالح , شکل و مکان ساختمان باید بر اساس این مقررات صورت گیرد و افراد قبل از کار در این مکان ها دوره های آموزشی مورد نظر را به طور کامل گذرانده باشند.

تمام قوامینی که در آزمایشگاه شیمی وجود دارد در آزمایشگاههای دارای استاندارد های Biosafety نیز اجرا می شود و علاوه بر آن باید قوامین بیشتری نیز رعایت نمود.

مقررات ایمنی زیستی در آزمایشگاهها

مقررات ایمنی زیستی سطح۱ (S1) Biosafety level 1 (S1)

مقررات این سطح برای آزمایشگاه های گروه اول وضع گردیده است و شامل موارد ذیل می باشد.

- آزمایشگاه ز سایر بخشهای ساختمان که محل عبور و مرور است جدا نشده است.

کارهای آزمایشگاهی عموماً بر روی میزها انجام می‌گیرد.

معمولاً از وسایل و دستگاههای خاصی (نظیر هودهای بیولوژیک) ستفاده نمی‌شود.

کار با ژن ها و پروتئین هایی صورت می گیرد که برای بشربیماری زا نمی باشند.

کارکنان آزمایشگاه تحت آموزشهای خاصی در ارتباط با آزمایشهای انجام شده قرار می‌گیرند و همگی با نظارت یک فرد که در زمینه میکروبیولوژی یا یکی از علوم مرتبطه تخصص دارد هدایت می‌شوند.

مقررات ایمنی زیستی سطح ۲ (S2) Biosafety Level 2 (S2)

مقررات ایمنی زیستی ۲ مشابه با نوع ۱ بوده و برای آزمایشگاههای گروه۲ ست که با عوامل نسبتاً خطرناک کار می‌شود(کار با ارگانیسم های بیماری زا و یا کار با ژن ها و پروتئین های آنها).

کارکنان آزمایشگاه برای حمل عوامل بیماریزا آموزشهای خاصی را گذرانده‌اند.

حضور در آزمایشگاه محدود بوده و فقط در هنگام انجام کار می‌باشد.

اگر کار آزمایشگاهی همراه با تولید آئروسلهای آلوده در محیط باشد، باید در زیر هود انجام گیرد.

مقررات ایمنی زیستی سطح ۳ (S3) Biosafety Level 3 (S3)

مقررات ایمنی زیستی سطح ۳ برای آزمایشگاه های گروه سوم می باشد که در آنها با عوامل بیماریزا خطرناکی که می‌توانند مرگبار نیز باشند کار می‌شود. علاوه بر مقررات ایمنی سطوح ۱ و ۲ :

کارکنان آزمایشگاه تحت آموزشهای خاصی در زمینه نحوه عمل عوامل بیماری‌زا و مرگ‌آور قرار می‌گیرند.

کارکنان آزمایشگاه تحت هدایت فردی که تجربه کار با عوامل خطرناک را دارد کار می‌کنند.

تمام مراحل کار با عوامل آلوده کننده زیر هود انجام می‌گیرد و افراد باید پوششهای محافظتی مناسب را در حین کار داشته باشند.

آزمایشگاه دارای طراحی خاصی است و کاملا سیستم آزمایشگاه بسته می باشد.

مقررات ایمنی زیستی سطح ٤ (S4) Biosafety Level 4 (S4)

مقررات ایمنی زیستی ٤ برای آزمایشگاه هایی که با عوامل مرگبار نظیر ویروس ایدز , هپاتیت کار می‌شود وضع شده است. علاوه بر مقررات ایمنی سطوح ۱ و ۲ و ۳:

کارکنان آزمایشگاه از لباسها و پوششهای خاصی استفاده می‌کنند.

جهت آلودگی‌زدایی از وسایل و مواد از یک اتوکلاو با دو درب که یک درب آن داخل آزمایشگاه و درب دیگر آن در خارج قرار دارد استفاده می‌شود. مواد آلوده پس از آلودگی زدایی از درب دیگر خارج می‌شوند.

تهویه آزمایشگاه توسط فیلترهای خاصی صورت می‌گیرد.

کارکنان آزمایشگاه پیش از خروج جهت آلودگی‌زدایی با مواد شیمیایی خاصی دوش می‌گیرند.

از آنجائیکه در آزمایشگاه های پژوهشکده مقررات ایمنی زیستی سطح ۲ اجرا می‌شود، این سطح ایمنی به تفصیل شرح داده می‌شود.

عملیات پیشگیری از آلودگی‌های میکروبی

حضور در آزمایشگاه فقط در موقع انجام کار و زیر نظر مسئول آزمایشگاه باشد.

سطوح کار ، هر روز قبل و بعد از کار آلودگی زدایی شود.

تمام پسمانهای مایع یا جامد قبل از دور ریختن، آلودگی زدائی شوند.

دستگاههای Pipetting مکانیکی استفاده شود. Pipetting با دهان اکیداً ممنوع است.

خوردن ، نوشیدن، سیگار کشیدن و استفاده از هر گونه وسیلهٔ آرایشی در محیط آزمایشگاه ممنوع است. مواد خوراکی فقط در کابینت‌ها یا یخچالهای مخصوص مواد غذایی که در خارج از آزمایشگاه می‌باشند، نگهداری می‌شوند.

باید تلاش زیاد در جهت حداقل نمودن تولید آئروسل صورت گیرد.

عملیات ویژه

مواد آلوده‌ای که جهت آلودگی زدائی به مکان دور از آزمایشگاه برده می‌شوند، باید در ظروف با دوام قرار گرفته و قبل از خروج از آزمایشگاه، درب آن بسته شود.

با توجه به اینکه تعدادی از آلودگی‌ها برای بعضی از افراد معمولاً خطرناک می‌باشد، ورود افراد به آزمایشگاه و کار آنها در آزمایشگاه با تشخیص مسئول آزمایشگاه می‌باشد.

هرگاه عوامل عفونی جهت استفاده در آزمایشگاه نیاز به تدارکات خاصی مانند واکسیناسیون داشته باشد، باید علائم اخطار دهنده بر روی درب آزمایشگاه نصب گردد. علائم اخطار دهنده باید نوع عفونت، نام مسئول آزمایشگاه، نام فرد استفاده کننده و تجهیزات خاص وارد شده به آزمایشگاه را نشان دهد.

در هنگام حضور در آزمایشگاه باید روپوش آزمایشگاه و چکمه پوشیده شود. قبل از خروج از آزمایشگاه پوشاک نامبرده را از تن درآورده و در آزمایشگاه گذاشته شود. در صورت آلودگی، روپوش تمیز پوشیده و پوشاک آلوده، آلودگی زدایی شود.

حیواناتی که در کار پژوهشی در نظر گرفته نشده‌اند، حق ورود به آزمایشگاه را ندارند.

باید دقت کافی جهت اجتناب از آلودگی پوستی با مواد عفونی صورت بگیرد. در هنگام حمل و نقل حیوانات آلوده و هنگام تماس پوست با مواد عفونی حتماً از دستکش استفاده کنید.

تمام پس ماندهای آزمایشگاه و حیوانخانه باید قبل از خروج، آلودگی زدایی شوند.

سوزنها و سرنگهای زیر جلدی فقط برای تزریق وخالی کردن مایعات از حیوانات آزمایشگاهی استفاده شود. برای تزریق یا خالی کردن مایعات عفونی از سرنگهای متصل شده به سوزن یا سرنگ یکبار مصرف استفاده شود. باید دقت کافی هنگام استفاده از سرنگ و سوزن صورت گیرد تا از خود تلقیحی اجتناب گردد. نباید سوزن را پس از استفاده خم کرد، شکست یا در غلاف سوزن قرار داد. سوزن و سرنگ باید سریعاً در ظرف مخصوص ظروف تیز و برنده (Safety Box) قرار گیرند وآلودگی زدایی شوند (ترجیحاً با اتوکلاو)

ریخته شدن مواد آلوده و بروز سوانح باید سریعاً به مسئول آزمایشگاه گزارش شود. کمکهای اولیه، مراقبت و درمان باید بدون در برداشتن هزینه برای افراد صورت گیرد. گزارش سوانح باید ثبت شده و حداقل برای ٤٠ سال بایگانی گردد.

افرادی که با مواد عفونت زای انسانی کار می‌کنند، باید نمونه‌های سرم آنها جمع‌آوری و نگهداری شود. هر پنج سال و یا پس از در معرض آلودگی قرار گرفتن نمونهٔ سرم تهیه شود. داشتن حداقل یک تاریخچهٔ پزشکی از کارمندان ضروری است.

سطوح ایمنی زیستی

راهنمای ایمنی	BSL1	BSL2	BSL3	BSL4
پرسنل آزمایشگاه باید دست های خود را بعد از کار با محیط های کشت و در آوردن دستکش ها وقبل از ترک آزمایشگاه بشویند.	Y	Y	Y	Y
خوردن، آشامیدن، سیگار کشیدن و به کار گیری لوازم آزمایشگاهی ممنوع مي باشد.	Y	Y	Y	Y
اشخاص باید با اصول ایمنی زیستی آشنا باشند.	Y	Y	Y	Y
اشخاص باید از عینک های ایمن یا محافظ در صورتی که احتمال آئروسل و پاشیده شدن ذرات وجود داشته باشد، استفاده کنند.	Y	Y	Y	Y
استفاده از پیپت ها با دهان ممنوع مي باشد	Y	Y	Y	Y

تمامی روش های آزمایشگاهی باید با حداقل تولید ذرات آئروسل باشد.	Y	Y	Y	Y
سطوح کار باید حداقل هر روز و بعد از استفاده ی هر مصرف کننده و بعد از ریخته شدن هر نوع ماده ی دوام پذیری تمیز شود.	Y	Y	Y	Y
وسایل تیز باید در محلی که طراحی شده است قرار گیرند.	Y	Y	Y	Y
آزمایشگاه باید تمیز نگه داشته شود و از روش های خوب و منظم به منظور استفاده و پاکیزه ماندن آزمایشگاه استفاده گردد.	Y	Y	Y	Y
همه ی مایعات و جامدات زباله باید رفع آلودگی شوند قبل از فشرده شدن زباله ها	Y	Y	Y	Y
باید بنامه ی کنترل حشرات و جوندگان ایجاد گردد.	Y	Y	Y	Y
آزمایشگاه باید دارای یک محفظه برای شستن دست ها باشد.	Y	Y	Y	Y
آزمایشگاهها نباید دارای فرش،سطوح چسبنده و سطوح غیر قابل تماس باشد.	Y	Y	Y	Y
میز کار آزمایشگاه باید غیر قابل نفوذ نسبت به آب و مواد شیمیایی باشد.	Y	Y	Y	Y
صندلی های آزمایشگاه باید محکم و ایمن باشند و فضای بین میزهای کار و کابینت ها و وسایل باید در دسترس برای ضد عفونی کردن باشند.	Y	Y	Y	Y
پنجره های آزمایشگاه که باز می باشند باید توسط شبکه های توری مسدود گردند.	Y	Y	Y	Y
مواد پرخطر باید به صورت قابل دسترس روی دیوار آزمایشگاه نصب شود.	Y	Y	Y	Y
برنامه ی کنترل کیفیت آزمایشگاه لازم می باشد برای استفاده ی اختصاصی از آن	Y	Y	Y	N
موادی در آزمایشگاه غیر ضروری می باشد از آزمایشگاه خارج شود.	Y	Y	Y	N
هودهای ایمنی زیستی لازم می باشد.	Y	Y	Y	N
سانتریفوژهای ایمن مورد نیاز می باشد.	Y	Y	Y	N
ریخته شدن و تصادفاتی که در نتیجه ی آن ارگانیسم های آلوده به rDNA در معرض قرار می گیرندباید فوراً به IBC و NIH/OBA گزارش شوند.	Y	Y	Y	N
هیچ ماده یا وسیله ای نمی تواند از ساختمان خارج شود مگر قبل از آن توکلاو شود و یا رفع آلودگی گردد.	Y	Y	Y	N
ایمنیزاسیون و تست های سرولوژیک برای عواملی که با دست سرو کار	Y	Y	Y	N

دارند لازم می باشد.				
کنترل های مورد نیاز برای دخول به آزمایشگاه و جریان غیر مستقیم هوا	N	N	Y	Y
پنجره ها باید بسته و بسته شدن تایید گردد	N	N	Y	Y
اتوکلاوها باید در محلی با دسترسی آسان قرار گیرند	N	N	Y	Y
دو محل برای درهای خروجی تعبیه گردد.	N	N	Y	Y
افراد کوچکتر از ۱۶ سال نمی توانند به آزمایشگاه وارد شوند.	N	N	Y	Y
درهای آزمایشگاه باید کاملاً بسته باشند وقتی که آزمایشات در حال انجام مي باشد	N	N	Y	Y
ماسک های جراحی و ماسک های تنفسی در آزمایشات حیوانی زده شود.	N	N	Y	Y
هوای فرسوده توسط فیلترهای HEPA دوباره شارژ می شوند.	N	N	N	Y
نشانگر پرسنل ها هر وقت که لازم باشد در دسترس باشد.	N	N	N	Y
مواد بیولوژیک باید به صورت بسته بندی در آید و سپس حذف شوند.	N	N	N	Y
لباس های خیابانی در آورده شوند و لباس های آزمایشگاهی تهیه شده و ضد عفونی می شوند و در خلال آزمایشات شسته و اتو می شوند.	N	N	N	Y
سیستم بازبینی پزشکی برای کسانی که وارد یا خارج می شوند گذارده شود.	N	N	N	Y
همه ی منافذ در ساختارها و سطوح گرفته شود.	N	N	N	Y
سطوح افقی که به وسیله ی گرد و غبار پوشیده می شود کاهش یابد.	N	N	N	Y
محل شستن دست ها و پاها نزدیک درب خروج تعبیه گردد.	N	N	N	Y
دسترسی به درهای با سیستم بسته شدن خودبه خود و قابل قفل	N	N	N	Y
اتوکلاوهای دو درب به منظور رفع آلودگی تهیه گردد.	N	N	N	Y
همه ی مایعات خروجی به وسیله ی حرارت رفع آلودگی گردند.	N	N	N	Y
یک محل مناسب تهیه گردد برای اشخاص که می خواهند لباس بپوشند.	N	N	N	Y

هودهای بیولوژیک

- هودهای بیولوژیک دسته I یا II سایر تجهیزات فردی مناسب در موارد زیر استفاده شود:

درصورتی که در مراحل کار ذرات آئروسل آلوده تولید می‌شود باید از این کابینتها استفاده شود.

در صورتی که غلظتهای بالا یا حجم‌های بزرگ از عوامل عفونی و یا DNA نو ترکیب استفاده می‌شود، در صورتی که درب ظروف آنها خوب بسته شده باشد می‌توان در هوای آزاد آزمایشگاه استفاده کرد ولی اگر ظروف بدون درب باشند کار فقط در هودهای بیولوژیک مجاز می‌باشد.

تسهیلات آزمایشگاهی(ساختار و نگهداری آزمایشگاه)

- آزمایشگاه باید به گونه‌ای طراحی شده باشد که به راحتی تمیز شود. کف پوش یکپارچه توصیه می‌شود. برای دیوارها رنگ روغنی پیشنهاد می‌شود. کف پوشها باید یکپارچه و بدون درز و شکاف باشند تا به راحتی تمیز شوند.

- روی میز کار باید نسبت به آب غیر قابل نفوذ و مقاوم به اسید، قلیا، حلالهای آلی و حرارت باشد.

- فضای بین میزکارها، کابینتها و وسایل باید به نحوی باشد که آزمایشگاه به راحتی قابل تمیز کردن باشد.

در هر آزمایشگاه دستشوئی جهت شستن دستها موجود باشد.

پنجره‌هائي که باز می‌شوند دارای توری باشند.

در آزمایشگاه اتوکلاو جهت استریل کردن پس ماندهای آلوده موجود باشد.

مقررات ایمنی کار با مواد بیولوژیک:

مقررات ایمنی کار با سیستم میزبانی *E. coli*

E. coli K12 از مرسوم‌ترین سیستم‌های مورد استفاده در آزمایشهای مهندسی ژنتیک می‌باشد. در صورتی که از این باکتری بعنوان میزبان پلاسمیدهای غیر قابل انتقال استفاده گردد, ایمنی سطح I برای کار با باکتری فوق در آزمایشگاه کافی است که نکات کلیدی آن به صورت زیر است:

کار با میزان فوق روی میزهای معمولی آزمایشگاه و کنار شعله امکانپذیر است.

سطوح کاری روزی یکبار و بعد از هر بار کار با این میزبان باید ضد عفونی گردد. عمل ضدعفونی کردن توسط ساولن ۱۰% یا اتانول ۷۰% صورت می‌گیرد.

در هنگام کار با باکتری فوق ظرف حاوی ساولن ۱۰% را برای انتقال تیوب‌ها و سرسمپلرهای آلوده بکار ببرید.

بعد از ضدعفونی کردن مواد آلوده و حذف ساولن ۱۰% وسایل آلوده اتوکلاو شوند.

پی‌پت کردن محلول باکتری توسط سمپلرهای خودکار صورت گیرد.

بعد از کار با ارگانیسم‌های فوق شستشوی دستها حتماً انجام شود. برای اینکار صابون مایع و شستشوی ۲۰ ثانیه کافی بنظر می‌رسد.

در صورتی که از این میزبان برای تولید مواد توکسیک مضر برای انسان و یاکلون سازی ژنوم‌های ویروسی استفاده گردد, در این صورت ایمنی زیستی سطح II بایستی بصورت زیر رعایت گردد:

۱- دسترسی به عامل فوق محدود گردد و توسط علائم هشدار دهنده مشخص گردد.

۲- کار با میزبان فوق در زیر هودهای بیولوژیک II و I صورت گیرد.

۳- لباسهای مخصوص کار در آزمایشگاه نظیر روپوش ، باید هنگام ترک آزمایشگاه تعویض گردد.

٤- در هنگام کار با این موجود از دستکش استفاده گردد و از آلودگی پوست با ارگانیسم‌های حاوی مولکولهای DNA نو ترکیب جلوگیری به عمل آورده شود.

۵- تمامی ضایعات ناشی از کارهای آزمایشگاهی قبل از دفع توسط مواد ضد عفونی کننده (ساولن ۱۰%) و اتوکلاو حذف شود.

٦- آلودگی‌های اتفاقی یا پاشیده شدن ارگانیسم‌های آلوده کننده یا حاوی DNA نو ترکیب به سرعت به مقامات مسئول گزارش داده شود و برای رفع آلودگی آن اقدام گردد.

مقررات ایمنی زیستي سطح ۲ برای کار با گیاهان آزمایشگاهی

۱- اصطلاح گلخانه به ساختاری دارای دیوار، سقف و کف گفته می‌شود که برای رشد دادن گیاهان تحت شرایط کنترل شده و محیط حفاظت شده استفاده می شود . دیوارها و سقف معمولاً از مواد شفاف که اجازه عبور نور خورشید را می‌دهند ساخته مي‌شوند.

۲- کف گلخانه از مواد شفاف قابل نفوذ به آب ساخته می‌شود . بتن توصیه می‌شود اما سنگ ریزه یا سایر مواد متخلخل نیز استفاده می‌گردد مگر اینکه ارگانیسم‌های مورد استفاده به راحتی از طریق خاک پخش شوند.

۳- پنجره‌های نصب شده در دیوارها و سقف را می‌توان جهت تهویه باز کرد ونیازی به حفاظ نیست، هر چند که باید از ورود حشرات جلوگیری کرد.

٤- حضور در گلخانه باید فقط در موقع کار و زیر نظر مسئول مربوطه باشد.

٥- نمام افراد باید از مقررات ایمنی سطح ۲ آگاهی داشته و آنها را رعایت کنند.

٦- همواره باید گزارشی از گیاهان, میکروارگانیسم‌ها و حیوانات کوچکی که جهت انجام آزمایش به داخل گلخانه آورده شده و یا از آن خارج می‌شوند تهیه شود.

۷- هر اتفاقی که منجر به رها شدن میکروارگانیسم‌ها در گلخانه شود باید بلافاصله به مسئول گلخانه و یا مسئول ایمنی گزارش شود.

۸- کلیه موجودات آزمایشی پس از اتمام کار و پیش از خارج کردن از گلخانه غیر فعال شوند.

۹- آلودگی‌زدایی از آب خروجی نیازی نیست اگر بخشی از گلخانه متشکل از سنگ ریزه یا مواد مشابهی است هر چند وقت یکبار باید اقدام به از بین بردن موجوداتی که ممکن است در آنها محبوس شده باشند نمود.

۱۰- ز انتشار گونه‌های ناخواسته موجودات نظیر حشرات و بندپایان وسایر پاتوژنها باید جلوگیری کرد.

بندپایان و سایر ماکروارگانیسم‌های متحرک را باید در محفظه‌های مناسبی نگهداری کرد و در صورت رها شدن آنها در محوطه گلخانه مانع انتشار آنها به خارج از گلخانه شد.

۱۱- می‌توان آزمایشهای تحت شرایط ایمنی زیستی سطح ۱ را همزمان با آزمایشهای تحت شرایط ایمنی زیستی سطح ۲ انجام داد و سطح دو را برای هر دو در نظر گرفت.

۱۲- در صورت انجام آزمایش خاصی باید علائمی نصب گردد که نشاندهنده فرد مسئول آزمایش نوع گیاه مورد استفاده و تسهیلات ویژه‌ای که استفاده می‌شود باشد.

۱۳- در صورت کار با ارگانیسم‌هایی که برای اکوسیستم طبیعی و یا اکوسیستم گلخانه مضر باشند، باید علائمی بر روی درهای گلخانه نصب گردد.

۱٤- اگر خطری متوجه افراد باشد باید توسط علائم ایمنی زیستی به اطلاع همه برسد.

کلیه مواد حاوی میکروارگانیسم‌هایی که بصورت زنده و یا دست نخورده وارد گلخانه شده و یا از آن خارج می‌شوند باید در ظرفهای درب دار مقاوم حمل شوند.

۱۵- باید یک دستور کار در گلخانه تهیه شود که درآن نتایج عدم رعایت نکات ایمنی و نیز روش مقابل به رها شدن ناخواسته ارگانیسم‌ها در گلخانه به افراد آموزش داده شود.

۱٦- باید یک اتوکلاو جهت آلودگی زدایی از مواد آلوده در دسترس باشد.

مقررات ایمنی زیستی سطح ۲ برای کار با حیوانات آزمایشگاهی:

محل نگهداری حیوانات باید مجهز به قفل باشد.

محل نگهداری حیوانات به تناوب مورد بازرسی قرار گیرد.

در ساختمانی واقع باشد که قابل کنترل و قفل کردن باشد.

تنها اشخاصی که از خطرات احتمالی آگاهی داشته و واجد شرایط هستند (نظیر دریافت کردن واکسنهای مناسب) می‌توانند وارد حیوانخانه شوند.

حیواناتی که در کار پژوهشی در نظر گرفته نشده‌اند نباید در حیوان خانه نگهداری شوند.

مواد آلوده‌ای که در محلی به دور از آزمایشگاه آلودگی زدایی می‌شوند باید قبل از خروج در ظروف درب دار با دوام حمل شوند.

سرنگها و سرسوزنها باید بلافاصله در ظروف مقاوم قرار گرفته و آلودگی زدایی شوند (ترجیحاً با اتوکلاو).

هنگامیکه کار پژوهشی با حیوان نیازمند آمادگی‌های قبل است (نظیر تزریق واکسن), باید هشداردهنده ایمنی زیستی بر روی تمام دربهای منتهی به حیوانخانه نصب شوند، این علائم باید نشان دهنده گونه حیوانات, عاملی که با آن کار می‌شود, نام و شماره تلفن مسئول حیوانخانه و سایر موارد مورد نیاز جهت ورود به آزمایشگاه باشند.

در هنگام حضور در آزمایشگاه باید از روپوش استفاده کرد. اما پیش از ورود در نواحی غیر آزمایشگاهی نظیر رستوران ، کتابخانه و اتاق استراحت آن را خارج نموده و در آزمایشگاه قرار داد.

مراقبت خاصی جهت جلوگیری از آلوده شدن با میکروارگانیسم‌های نوترکیب باید به عمل آورد و در موقع کار با حیوانات و هنگامی که تماس با عوامل آلوده کننده اجتناب ناپذیر است باید از دستکش استفاده کرد.

هر اتفاقی که منجر به رها شدن ارگانیسم‌های حاوی DNA نوترکیب در محیط و یا آلوده شدن حیوانات و کارکنان آزمایشگاه با آنها گردد باید بلافاصله به مسئول حیوانخانه و یا مسئول گزارش شود.

تمام پس‌ماندهای بیولوژیکی باید در دو ظرف مقاوم که درون هم قرار می‌گیرند ریخته شوند و پیش از دور ریختن آلودگی زدایی شوند.

تمام نوزادانی که به نوعی مهندسی ژنتیک بر روی آنها انجام شده باید تا ۷۲ ساعت پس از بدنیا آمدن علامت‌گذاری شوند.

برای انجام تزریقات یا کشیدن مایعات از بدن حیوانات از سرنگهای یکبار مصرف و متصل به سوزن استفاده شود و باید دقت کافی به منظور جلوگیری از خود تلقیحی و ایجاد آئروسل انجام گیرد . نباید سوزن را پس از مصرف خم کرد، شکست یا در غلاف آن قرار داد. سوزن و سرنگ باید سریعاً در ظرف مخصوص ظروف تیز و برنده قرار گیرند و آلودگی زدایی شوند.

در صورتی که امکان انتقال آلودگی (میکروارگانیسم ،DNA نوترکیب و ...) توسط عواملی نظیر بندپایان و یا سایر راهها وجود دارد باید دقت کافی جهت جلوگیری از انتشار آن به عمل آید.

خوردن، آشامیدن و سیگار کشیدن در آزمایشگاه ممنوع است.

افرادی که با مواد و حیوانات دارای DNA نوترکیب کار می‌کنند باید پیش از خروج دستهای خود را بشویند.

شرایط نگهداری حیوانات باید مطابق با قوانین حمایت حیوانات باشد.

باید یک دستور کار رعایت نکات ایمنی زیستی در آزمایشگاه وجود داشته باشد و همه ملزم به مطالعه و رعایت آن دستورات باشند.

سطوح کار باید نسبت به آب غیر قابل نفوذ و مقاوم به اسید، فلیا، حلالهای آلی و حرارت باشند.

محل نگهداری حیوانات باید به راحتی قابل تمیز کردن باشد.

پنجره‌هایی که باز می‌شوند دارای توری باشند.

ایمنی کار با نمونه‌های دارای DNA نوترکیب

اسیدهای نوکلئیک که در مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند را می‌توان به صورت زیر دسته‌بندی کرد:

اسیدهای نوکلئیک با ساختار DNA

cDNA ژنوم‌های RNA ویروسی

پلاسمیدها

ترانسپوزون‌ها

ناقل‌های مصنوعی

واکسن های DNA

اسیدهای نوکلئیک با ساختار RNA

آنتی سنس RNA

ریبوزیم‌ها

واکسن‌های RNA

ناقل‌های RNA ویروسی

RNA-DNA هیبریدها

رهاسازی اسیدهای نوکلئیک در محیط از روشهای مختلفی صورت می‌گیرد:

زباله‌های میکروارگانیسم‌های تراریخت

زباله‌های کشت سلولی و محصولات گیاهی تراریخت

زباله‌های جانوران تراریخت

غذای مهندسی شده

نسوج گیاهی مهندسی شده نظیر کتان

گرد و خاک و دانه گرده محصولات مهندسی شده

اسیدهای نوکلئیک در محیطهای طبیعی قدرت بقا داشته در ضمن بعضی از انواع آنها قادر به انتقال از یک ارگانیزم به ارگانیزم دیگر می‌باشند. اسیدهای نوکلئیک می‌توانند ٦ خطرات احتمالی به صورت زیر داشته باشند:

ایجاد شوک توکسیک در زمان استفاده از ناقل‌های ویروسی

واکنش ایمونولوژیکی در زمان استفاده از ناقل‌های ویروسی

ایجاد واکنش‌های اتو ایمن توسط DNA دو رشته‌ای و RNA

تولید ویروس‌های نوترکیب بیماریزا

ایجاد موتاسیون (Insertion mutagenesis)

Insertion oncogenesis

آلودگی ژنتیکی سلولهای زایشی

بسته به نوع کار پژوهشی با اسیدهای نوکلئیک مقررات ایمنی اعمال خواهد شد که مجری پروژه‌های تحقیقاتی ملزم به آموزش نکات ایمنی اختصاصی کار خویش می‌باشند. مقررات کلی ایمنی زیستی در سطح آزمایشگاههای مرکز (ایمنی زیستیII) برای کار با DNA به صورت زیر است:

پوشیدن روپوش آزمایشگاه و دستکش در حین کار با نمونه‌های DNA ضروری است.

زباله‌های آلوده به DNA باید از زباله‌های غیر آلوده جدا شده و زباله‌های آلوده در نهایت اتوکلاو شوند.

از ریختن محلولهای آلوده به DNA در سینک‌های ظرفشویی به شدت خودداری گردد.

در صورت آلوده شدن سطوح آزمایشگاه با DNA نوترکیب ، سطوح توسط اسید رقیق شسته شده پس از شستشوی اسید با آب، ضد عفونی کردن سطوح با الکل صورت گیرد.

پیشنهاد می‌گردد که قبل از کار با DNA سطوح آزمایشگاهی توسط پوشش‌های دو قسمتی (پلاستیک، بخش قابل نفوذرویی) پوشیده گردد و در انتهای کار جمع شده و اتوکلاو شود.

مسلماً رعایت نکات ذکر شده می‌تواند احتمال وقوع خطر را به حداقل برساند.

مقررات ایمنی کار با خون و فرآورده‌های آن

نمونه‌های خونی مورد آزمایش از جهت همراه بودن با انواع ویروسهای بیماریزای انسانی بسیار خطرناک است . مشخص شده است که در ۱ml از خون ۵۰-۱۵ ویروس HIV و حدود $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۹}$ ذره ویروسی هپاتیت B وجود دارد این ذرات ویروسی HBV برخلاف ذرات ویروسیHIV قادرند در خارج بدن موجود زنده به

مدت چندین روز زنده باشند. تعداد ذرات ویروسی HCV ۱۰ برابر ذرات ویروسی HIV است . مسلماً رعایت نکات ایمنی در آزمایشگاههای فوق ضروری بوده و هرگونه بی‌احتیاطی می‌تواند خطرات بالقوه جبران‌ناپذیر را در برداشته باشد.

آزمایشگاه تحقیقاتی مربوط به نمونه‌های خونی باید در مکان مشخص و جدا از سایر بخش‌های آزمایشگاهی ساخته شود.

افراد در ارتباط با این نمونه‌ها بایستی واکسینه شده و در مواقع بروز حادثه فرم‌های مخصوصی را پر کنند و در فرم‌های مذکور علل بروز حادثه ذکر گردد.

پوشیدن دستکش ، لباس‌های مناسب آزمایشگاهی ، شستشوی مداوم دستها، عدم استفاده از کفشهای روباز و عدم استفاده از لنز و لوازم آرایشی به شدت توصه می‌گردد.

استفاده از هودهای بیولوژیک در حین کار توصیه می‌گردد. سطح کاری توسط bench-cever (که متشکل از یک لایه پلاستیک و بخش جاذب رویی) پوشیده شود تا بعد از اتمام کار پوشش فوق جمع شده و اتوکلاو گردد.

در صورت آلوده شدن میزهای آزمایشگاه توسط خون، میز و یا جایگاه آلوده توسط ماده ضدعفونی کننده آب ژاول ۱۰%، سود ۵% مولار و SDS ۰/۵ % ضد عفونی شده و سپس با آب آبکشی گردد.

نمونه‌های آلوده پس از علامت‌گذاری اتوکلاو گردند.

پاکسازی منظم و دوره‌ای در محوطه‌های فوق بایستی انجام گیرد.

آشنایی با علائم هشدار دهنده درآزمایشگاه:

۱- علائم هشدار دهنده شیمیایی

۲- علائم هشدار دهنده بیولوژیک

۳- علائم هشدار دهنده رادیو اکتیو

۴- علائم هشدار دهنده الکتریکی

توضیح علائم روی بسته مواد

E(Explosive)در جایی غیر از انبار مواد نگهداری شود(قابل انفجار)

O(Oxidizing- Fire Promoting)(اکسید کننده- قابل اشتعال)تماس با مواد قابل اشتعال به حداقل برسد.

T(Very toxic)(بسیار سمی)تماس بابدن به هرشکلی محدود شود(رعایت حداکثر موارد ایمنی).

T(Toxic)سمي.

Xn(Harmful)(مضر) باید بادست تماس پیداکند.

F+(Exteremely flammable)(بشدت قابل اشتعال)دردمای زیر صفر نگهداری شود.

F(Highly flammable)نگهداری دردمای زیر $۲۱^{\circ}C$

C(Corrosive)(خورنده)ز تماس باکلیه سطوح بدن جلوگیری شود.

Xi(lrritant) کم خطر ترین

مواد شیمیایی را از لحاظ سمیت وزیان می توان به یکی از چهار دسته زیر تقسیم کرد:

مواد با زیان بسیار زیاد: شامل موادسرطان زا، جهش زایا مسموم کننده درتولید مثل وحساسیت زاهای تنفسی

مواد بازیان زیاد:موادبسیار سمی،مولد سوزاننده وحساسیت زاهای پوستی

مواد با زیان متوسط:مواد مضر،مواد محرک وسوزش آور

مواد با زیان کم:موادی که بعنوان مواد خطرناک شناخته نمی شوند.

علائم هشدار دهنده شيميايي	علامت	مفهوم	کد
	C	خورنده فلز	R34 :ايجاد اثرات سوختگي
			R35 : ايجاد اثرات شديد سوختگي
	E	خطر انفجار	R2 : قابليت انفجار در اثر ضربه
			R3 : قابليت انفجار آسان در اثر ضربه، آتش ويا ديگر منابع قابل اشتعال
	F+	قابليت زياد اشتعال	R12 : شديداً قابل اشتعال
	F	قابليت كم اشتعال	R11 : قابليت جزئی اشتعال
			R15 : آزاد كردن گازهايی با قابليت زياد اشتعال، درصورت تماس با آب
			R17 : خود به خود قابل اشتعال درمعرض هوا

	O	مواد آتش زا (اکسید کننده)	R7 : امکان ایجاد حریق
			R8 : خطر ایجاد حریق در صورت تماس با مواد قابل اشتعال
			R9 : خطر انفجار در صورت ترکیب با مواد قابل اشتعال
	T+	بسیار سمی	R26 :بسیار سمی در صورت تنفس
			R27 :بسیار سمی در صورت تماس با پوست
			R28 :بسیار سمی در صورت خوردن
	T+	بسیار سمی	R39 :بسیار سمی : خطر بسیارجدی ایجاد آسیب های جبران ناپذیر
			R39/26 :بسیار سمی : خطر جدی ایجاد آسیب های جبران ناپذیر
	T	سمي	R23 :سمي در صورت تنفس
			R24 :سمي در صورت تماس با پوست

	T	سمي	R25 :سمی در صورت خوردن R48 : خطر آسیب های جدی برای سلامتی در صورت گذاشتن طولانی در فضای باز
	Xn	ایجاد حساسیت در صورت تنفس	R42 :امکان بروز حساسیت در صورت تنفس
	Xi	ایجاد حساسیت در صورت تماس با پوست	R43 : امکان بروز حساسیت در صورت تماس با پوست
	Xn	مضرر برای سلامتي	R20 : مضرر برای سلامتي در صورت تنفس R21 : مضرر برای سلامتي در صورت تماس با پوست R22 : مضرر برای سلامتي در صورت خوردن
	Xn	مضرر برای سلامتي	R45 : مضرر برای سلامتی در صورت تنفس R40 : مضرر برای سلامتی در صورت تماس با پوست

			R48 : مضرر برای سلامتی در صورت خوردن
	Xi	سوزش آور و تحریک کننده	R36 : سوزش آورنده چشم ها
			R37 : تحریک کننده دستگاه تنفسی
			R38 : سوزش آورنده چشم ها
			R41 : خطر آسیب جدی برای چشم ها
	N	خطرناک برای محیط زیست	R50 : سمي برای موجودات زنده آبزی ها
			R51 : سمي برای موجودات زنده آبزی ها
	N	خطرناک برای محیط زیست	R54 : سمي برای گیاهان
			R55 : سمي برای جانوران
			R56 : سمي برای موجودات زنده خاک
	N	خطرناک برای محیط زیست	R57 : سمی برای زنبورها

			R58 : امکان بروز اثرات مضرر طولانی مدت در محیط زیست
	N	خطرناک برای محیط زیست	R59 : خطرناک برای لایه ازن
			R52 : مضرر برای موجودات زنده آبزی
			R53 :مکان بروز اثرات مضرر طولانی مدت در محیط زیست آب
علائم هشدار دهنده بیولوژیک	علامت	مفهوم	کد
	T	خطر بیولوژیکی: سرطانزا از گروه ۱+۲	R45 : امکان ایجاد سرطان
			R49 :مکان ایجاد سرطان در صورت تنفس

	Xn	خطر بیولوژیکی: سرطانزا از گروه ۳	R40 : خطر احتمالی آسیب های جبران ناپذیر
	T	خطر بیولوژیکی: خطر آسیب رسیدن به قدرت تولید مثل	R60 : امکان آسیب رسیدن به قدرت تولید مثل R61 : امکان آسیب رسیدن به جنین انسان
	Xn	خطر بیولوژیکی: خطر آسیب رسیدن به قدرت تولید مثل	R62 : خطر احتمالي آسیب رسیدن به قدرت تولید مثل انسان R63 : خطر احتمالي آسیب رسیدن به جنین انسان
	Xn	خطر بیولوژیکی: ایجاد تغییرات وراثتی	R40 : خطر احتمالی ایجاد آسیب های جبران ناپذیر

علائم هشدار دهنده الكتريكي	مفهوم	كد بين المللى
	خطر برق گرفتگي	
علائم هشدار دهنده راديو اكتيو	مفهوم	كد بين المللى
	خطر تشعع	

وسائل آزمایشگاهی کوچک

میکروپیپت

برای برداشتن حجم مورد نظر خود توسط میکروپیپت به نکات زیر توجه فرمایید:

۱- میکروپیپت را به آرامی و با دقت بر روی حجم مورد نظر تنظیم کنید.

۲- تیپ یکبار مصرف را به میکروپیپت متصل نمایید بطوریکه از جایگیری درست و محکم آن مطمئن باشید.

۳- دکمهٔ عملگر(operating Botton) را تا اولین ایست (First stop) آن فشار دهید.

٤- نوک تیپ را درست زیر سطح مایع (۲-۳mm) قرار دهید و دکمهٔ عملگر را به آرامی و بطور یکنواخت آزاد کنید. میکروپیپت را در طی کشیدن مایع عمود نگهدارید. در مورد مایعاتی که ویسکوزیته و دانسیته آنها با آب متفاوت می‌باشد بهتر است که با پر و خالی کردن تیپ ، درون آنرا با آن مایع مرطوب نمایید.

۵- سرتیپ را به دقت از درون مایع بیرون آورده به کنارهٔ درون ظرف بکشید تا مقادیر اضافی به جدار بیرونی آن باقی نمانده باشد.

٦- مایع کشیده شده با فشار آرام دکمهٔ عملگر تا اولین ایست خارج می‌شود . پس از توقف کوتاهی در اولین ایست، دکمهٔ عملگر را تا دومین نقطهٔ ایست فشار دهید تا از تخلیه کامل آن مطمئن شوید.

هرگز از میکروپیپت در خارج از محدودهٔ مشخص شده برای آن استفاده نکنید.

پیشنهاد می‌شود که در هنگام عدم استفاده از میکروپیپت آنرا در وضعیت عمودی نگهدارید.

برا ی تمیز کردن میکروپیپت از آب یا اتانول ۷۰% و یک پارچهٔ نرم یا دستمال بدون پرز استفاده کنید. پیشنهاد می‌شود که محل اتصال تیپ به میکروپیپت بطور منظم تمیز شود. هرگز برای پاک کردن سطوح خارجی میکروپیپت از مواردی نظیر گزیلل یا سایر حلالهای مواد پلاستیکی استفاده نکنید.

مراقب باشید هنگام برداشتن مواد شیمیائی تنها تیپ با آنها تماس یابد و خود میکروپیپت آلوده نشود.

مایع نباید وارد میکروپیپت شود . بنابراین هرگز هنگامیکه تیپ حاوی مایع می‌باشد آنرا سروته یا بطور افقی نگه ندارید.

همیشه حجم کشیده شده توسط میکروپیپت را با چشم کنترل کنید تا مطمئن شوید حجم مورد نظر شما کشیده شده است.

در هنگام کشیدن مواد با چگالی بالا مثل گلیسرول و تریتون ، علاوه بر رعایت آرامش در کار ، هیمشه پس از آزادی کامل دکمهٔ عمگر نوک تیپ را تا چند لحظه در مایع نگه دارید تا حجم مورد نظر شما بطور کامل کشیده شود . در صورتیکه نیاز به برداشتن حجمهای بیشتری از این مواد باشد می‌توان برای سهولت کار، سرتیپ را چید. این مورد برای برداشتن سوسپانسیون‌هایی مثل سوسپانسون سلولی نیز صادق است.

تا حد امکان از کشیدن مواد خورنده‌ای مثل اسید و بازهای قوی با استفاده از میکروپیپت خودداری کنید؛ زیرا بخارات این مواد باعث خوردگی و زنگ زدن فنر میکروپیپت می شود . بهتر است در این موارد از پیپت‌های شیشه‌ای استفاده شود. در صورت اجتناب‌ناپذیر بودن استفاده از میکروپیپت برای این مواد پیشنهاد می‌شود که پس از اتمام کار میکروپیپت باز و پیستون و اجزای درونی آن شسته و تمیز گردد.

در صورت آلوده شدن میکروپیپت به خون، فراورده‌های خونی یا سوسپانسیون میکروبی اگر میکروپیپت قابل اتوکلاو کردن است از این روش استفاده کنید. در غیر صورت قسمت آلوده را با دقت از میکروپیپت جدا کرده و به مدت یکساعت در ساولن ۱۰%قرار داده پس از شستشو با آب به مدت ۱۰ دقیقه در SDS۱۰% و پس از شستشوی مجدد با آب به مدت ۱۰ دقیقه در الکل ۷۰% قرار دهید . در نهایت وسیله را با مقادیر فراوانی آب شستشو و در هوا خشک کنید.

آزمون کالیبراسیون

به دقت تیپ را به سر میکروپیپت متصل نمایید.

تیپ را با کشیدن آب مقطر به اندازهٔ حجمی 5 برابر حجم مورد نظر مرطوب کنید.

به دقت حجم مورد نظر از آب مقطر را کشیده در هنگام کار میکروپیپت را عمود نگه دارید.

آب مقطر کشیده شده را روی یک کاغذ ضد آب یا ظرفی که روی ترازو صفر شده است خالی کنید و وزن آنرا بخوانید . این کار را حداقل ده بار انجام دهید و نتیجه هر بار را ثبت کنید (توزین باید در دما ۲۵-۲۰صورت گیرد).

نتایج را با محدودهٔ حجم مجاز کالیبراسیون مربوطه مقایسه کنید. اگر متوسط ۱۰ بار خواندن درون محدودهٔ مجاز باشد، میکروپیپت آماده استفاده است(خطای حدود 1% قابل اغماض و مربوط به خطای دستگاه است). اگر نتایج خارج از محدوده باشد نیاز به کالیبراسیون مجدد می‌باشد.

روش کالیبراسیون

ابزار کالیبراسیون را در حفره‌های قفل تنظیم کالیبراسیون (زیر تکمه عملگر) جای دهید.

قفل تنظیم را برای کاهش حجم در خلاف جهت عقربه‌های ساعت و برای افزایش در جهت عقره‌های ساعت بگردانید.

رویهٔ آزمون کالیبراسیون را تکرار کنید تا نتایج دقیق به دست آید.

وسایل شیشه‌ای

از گذاشتن وسایل شیشه‌ای درجه‌بندی شده ای که به منظور حجم سنجی‌های دقیق به کار می‌رود در حرارت خودداری کنید. زیرا گرم و سرد شدن‌های متوالی از دقت درجه بندی آنها می‌کاهد.

از نوشتن یادداشت روی درجه‌بندیها اجتناب کنید زیرا ممکن است هنگام پاک کردن یادداشتها، درجه بندیها نیز پاک شوند.

پس از اتمام کار ظرف مورد استفاده را با روش مناسب کاملاً تمیز نموده و یادداشت روی آنرا پاک کنید.

برای شستشوی ظروف شیشه‌ای از اسفنج یا پارچه نرم استفاده کنید تا روی آنها شکاف یا خشی ایجاد نشود.

هنگامی که در نظر دارید از یک ظرف شیشه‌ای تحت شرایط خلاء استفاده کنید یا آنرا حرارت دهید ابتدا از سالم بودن آن اطمینان حاصل کنید ، در غیر این صورت خطرات جدی شما و اطرافیان را تهدید خواهد کرد.

برای شستشوی ظروف خیلی کثیف باید از خیساندن شبانه در محلول اسید کرومیک استفاده شود.

اگر احتمال می‌دهید که یک ظرف شکسته یا ترک خورده قابل تعمیر است با رعایت نکات ایمنی آنرا به بخش شیشه‌گری منتقل کنید و در غیر این صورت آنرا در ظروف مخصوص اجسام نوک تیز و برنده قرار دهید.

ورتکس

پیش از استفاده از دستگاه‌های ورتکس رومیزی از محکم بودن بخش چرخندهٔ آن اطمینان حاصل کنید.

سعی کنید حتی الامکان به صورت تراز از آن استفاده کنید . بطور مثال از اسپین کردن یک ویال که در مقابل آن یک ویال دیگری قرار نداده‌اید خودداری فرمایید.

استفاده از ورتکس تنها برای مواد خاصی همچون مخلوط کردن بافرها مناسب است. DNAهای بزرگ و ... در اثر ورتکس آسیب خواهند دید.

در هنگام ورتکس کردن از محکم بودن درب ویال ها و غیر قابل نشت بودن آنها مطمئن شوید، زیرا نشت مواد باعث ایجاد اشکال در آزمایش شما و بروز مشکلات ایمنی می‌گردد.

ویال

قبل از شروع کار از سالم بودن (سوراخ نبودن) و تمیز بودن ویال اطمینان حاصل کنید.

سعی کنید در هر آزمایش از ویال مناسب آن کار استفاده کنید.

در هنگام کار خصوصاً در مورد مواد فرار سمی و خطرناکی مثل فنل از محکم بودن و عدم نشت در ویال مطمئن شوید.

برای باز کردن درب ویال از روش مناسبی استفاده کنید تا محتویات آن یکباره به بیرون پاشیده نشود.

در هنگام استفاده از ظروف یکبار مصرف مثل ویال، فالکون، پلیت و ... به جنس پلیمر سازندهٔ آن توجه داشته باشید. برخی از آنها مثل پلی پروپیلن (Polypropylene) قابل اتوکلاو کردن هستند و برخی دیگر مثل پلی اتیلن (Polyethylene) را نمی‌توان اتوکلاو کرد. ضمناً این ظروف نسبت به تمامی مواد مقاوم نبوده با برخی از آنها واکنش می‌دهند برای مثال پلی کربناتها نسبت به انواع الکلها مقاوم نیستند.

صفحهٔ گرم‌کننده (Hot plate)

این دستگاه یک وسیلهٔ الکترونیکی است که استفاده از آن در محدودهٔ دمایی مشخصی مجاز می‌باشد ($۸۰^{\circ}C$-۱۵). بنابراین از تنظیم آن روی دماهای بالاتر از مجاز خودداری کنید زیرا باعث ایجاد آسیب در سیستم الکترونیکی زیر آن می‌شود.

برای تنظیم دمای آن از اجسام نوک تیز مثل خودکار و ناخن استفاده نکنید زیرا باعث خراب شدن تکمه‌های حساس می‌شود.

برای سرد کردن دستگاه جداً از خیس کردن آن به هر صورت اجتناب نمایید.

در صورتیکه حجم مادهٔ درون یک ویال زیاد باشد، دمای بالا باعث ایجاد فشار و باز شدن خود به خودی درب و بیرون پاشیدن محتویات آن می‌شود در این موارد یک منفذ خروجی برای آن تعبیه کنید یا حجم کمتری در هر ویال بریزید.

بن ماری (حمام آب)

محفظهٔ بن‌ماری باید همیشه حاوی مقدار کافی آب مقطر تمیز باشد . بنابراین قبل از روشن ساختن آن از کافی بودن حجم آب اطمینان حاصل کنید، خصوصاً زمانیکه می‌خواهید شبانه یا برای مدت طولانی دستگاه را روی

دمای بالایی روشن بگذارید . بدیهی است که کم شدن آب آن باعث بروز آسیب در دستگاه و آتش سوزی خواهد شد.

برای پرکردن بن‌ماری از آب یکبار تقطیر استفاده نمایید. مراقب باشید که نمونه‌های شما به آب نفوذ نکند. در صورت مشاهدهٔ آلودگی در آب بن‌ماری بلافاصله آب آنرا بطور کامل تخلیه و پس از شستشوی محفظه آنرا از آب تمیز پر نمایید.

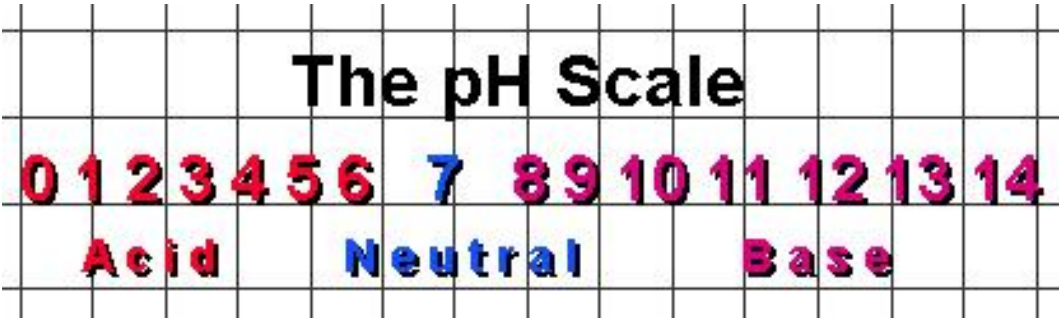
در صورت استفادهٔ بلند مدت خصوصاً در دماهای بالا در محفظه را بسته نگهدارید تا از تغییر بیش از حد ، فشار آمدن به دستگاه و کثیف شدن احتمالی آن جلوگیری شود.

اگر می خواهید از سردکننده (Chiller) ستفاده کنید، حتماً لازم است بن‌ماری را هم روی دمای مورد نظر تنظیم و آنرا روشن نمایید . توجه داشته باشید که هنگام قرار دادن سر مار پیچ در آب, دمای آب بالاتر از دمای اتاق نباشد.

از بن‌ماری‌های دقیق برای دماهای بالاتر از $55\ ^{\circ}C$ استفاده نکنید.

pH متر

pH هر محلول با بدست آوردن لگاریتم غلظت یون هیدرونیوم و تغییر علامت آن بدست می‌آید.



انواع الکترود

از نظر نوع عملکرد مورد انتظار و ساختمان الکترودها بسیار متنوعند . در جدول زیر نوع کاربرد برخی الکترودها خلاصه شده است:

نمونهٔ مورد آزمون	نوع الکترود
نمونه‌های بیولوژیکی، پروتئینها، Tris بافر	کالومل یا Double Junction
نمونه‌های دارویی	کالومل یا Double Junction
اسید هیدروفلوریک	الکترود انتیموان یا HF
آب آشامیدنی	الکترود نقره Single Junction
پساب	Double Junction
محلولهای با فلزات سنگین	Double Junction
نمونه‌های خاک	الکترود خاک یا Double Junction
PH بالاتر از ۹ و یون +Na زیاد	حباب شیشه‌ای Amber یا Ag/AGcl

الکترودهای Single Junction کاربردهای عمومی دارند اما الکترودهای Double Junction جهت تعیین pH محلولهای ویسکوز یا محلولهای دارای سولفیدها ، فلزات سنگین یا Tris بافر به کار می‌روند. لکترود

مرجع نقره استفاده‌های عمومی دارد و گسترهٔ دمایی تا $80^{\circ}C$ را در برمی‌گیرد الکترود کالومل در مواردی که محلولهای مورد آزمون با یونهای نقره واکنش داده و موجب انسداد Junction می‌شوند کاربرد دارد.

الکترود pH متر موجود در آزمایشگاه ژنومیکس از نوع Double Junction می‌باشد.

نحوه استفاده از دستگاه pH متر آزمایشگاه ژنومیکس:

برای اندازه‌گیری دقیق pH محلول‌ها لازم است ابتدا دستگاه کالیبره شود. به این منظور بسته به pH نهایی مورد نظر از بافرهای استاندارد با pH (۷ و ۱۰) و یا (۷ و ٤) استفاده نمائید. کالبراسیون دستگاه حتی بعد از خاموش شدن آن حفظ می‌شود. در هر بار اندازه‌گیری قبل از فرو بردن الکترود در محلول لازم است آن را با آب مقطر شسته و با دستمال کاغذی خشک کرد. سطح Kclموجود در الکترود و محفظه نگهداری آن را کنترل نمائید. موقع اندازه‌گیری pH لازم است درپوش الکترود را باز نگه دارید.

الکترود pH متر را با آب مقطر شسته و آب اضافی دور الکترود را با تماس آرام دستمال کاغذی خشک کنید. مراقب باشید حتی به مدت کوتاه نباید الکترود کاملا خشک شود.

الکترود را درون محلول استاندارد ۱ (pH= ۷) قرار دهید.

دستگاه را روشن کنید.

کلید pH CAL را فشار دهید.

بعد از اینکه دستگاه pH بافر اول را اندازه گرفت علامت bu2 روی نمایشگر دستگاه ظاهر می‌گردد، بعد از شستن الکترود با قرار دادن آن در محلول استاندارد ۲، دستگاه را با بافر دوم هم کالیبره کنید.

بعد از کالیبراسیون با قرار دادن الکترود در محلول با pH مجهول می‌توانید pH آن را اندازه-گیری نمائید.

هنگامی که کار اندازه‌گیری pH پایان یافت، الکترود را از محلول خارج و با آب مقطر بشوئید، در پوش آن را در جای خود محکم نمایید و از قرار گرفتن آن در Kcl اطمینان حاصل کنید.

خطاهای pH متر

۱- خطای قلیایی: در محلول با pH=۹ یا بزرگتر بعضی از غشاهای شیشه‌ای نه تنها تغییرات غلظت یون هیدروژن بلکه تغییرات غلظت یونهای فلزات قلیایی (مثل Na^{+} و K^{+}) را نیز نشان می‌دهد. خطای pH در pH های بالا منفی است و قرائتها کمتر از مقدار واقعی هستند تمام کاتیونهای تک بار کم و بیش خطای قلیایی بوجود می‌آورند.

۲- خطای اسیدی: الکترود شیشه‌ای در محلولهای با pH کمتر از ۰/۵ خطایی نشان می‌دهند که علامت آن در جهت مخالف خطای قلیایی است. در اینجا قرائتها زیادتر از مقدار واقعی هستند.

آب زدایی: خشک شدن الکترود باعث عملکرد ناپایدار و خطا می‌گردد.

۳- خطا در محلولهای غیر بافری خنثی: تعادل بین سطح الکترود و اینگونه محلولها بکندی صورت می‌گیرد برای رفع این خطا باید تا برقراری تعادل (چند دقیقه) صبر نمود.

٤- خطا در pH بافر استاندارد: عدم دقت در تهیه بافر استاندار یا تغییر ترکیب آن در اثر نگهداری طولانی مدت و یا فساد آن توسط باکتری در اندازه گیری pH خطا ایجاد می‌نماید.

موارد احتیاط

هرگز الکترود را حتی در حد کمتر از یک دقیقه کاملاً خشک نکنید.

بعد از اتمام کار از قرار گرفتن کامل الکترود در ویال حاوی Kcl اشباع مطمئن شوید.

در صورت عدم دسترسی به Kcl اشباع هرگز الکترود را در آب مقطر قرار ندهید . در این حالت نخست از محلول استاندارد pH= ٤ و در درجه بعدی از آب لوله کشی استفاده نمایید.

از یکنواخت بودن محلول مورد بررسی اطمینان حاصل نمایید در صورت لزوم از کاغذ صافی برای جدا کردن ذرات معلق بهره بگیرید.

از تنظیم pH محلولهای محیط کشت همراه با آگار جامد یا ذوب شده اکیداً خودداری فرمایید.

pH های بالاتر از ۱۲ و پایین‌تر از ۳ دارای خطای قلیایی و اسیدی است، قبل از اندازه‌گیری pH انها را به محدوده مورد نظر نزدیک نمائید.

مشخصات محلول و pH آن را به همراه تاریخ و نام خود در دفتر دستگاه ثبت نمایید.

پیغام‌های خطا در دستگاه pH- متر

در همه حال با نمایش پیغامهای خطا قبل از شروع هر عملیاتی باید از صحت اتصالات دستگاه و الکترود اطمینان حاصل کرد سپس سطح محلول داخل الکترود مورد بررسی قرار گیرد و در صورت کمبود، محلول اضافه شود. در صورت عدم رفع خطا با نسب کاغذی که مورد خطا روی آن نوشته شده باشد، مسئول آزمایشگاه را از وجود اشکال در سیتم مطلع نمائید.

مایکروویو

امواج مایکروویو از دسته امواج الکترومغناطیس هستند(با طول موج حدود ۱۲۰ نانومتر)مانند امواج رادیویی، در دستگاه مایکروویو نیروی الکتریسه به وسیله تیوپ مگاترون به امواج مایکروویو تبدیل می شود، امواج مایکروویو از تیوپ مگاترون به طرف محفظه فر (جایی که جذب، منعکس یا عبور می کنند) حرکت مي کنند.

در کار با این دستگاه 5 عامل اصلی اندازه ظرف، مقادیر، غلظت، زمان و قدرت امواج قابل تنظیم است. انرژی الکترومغناطیس در فرکانس مایکروویو یکی از پاکیزه‌ترین و بی‌زیان‌ترین منابع ایجاد گرما می‌باشد ولی در کار با دستگاه باید نکات زیر را رعایت نمود.

۱- به هیچ وجه نباید وسایل با ضمایم فلزی مانند فویل آلمینیومی را داخل دستگاه قرار داد زیرا به محض شروع به کار دستگاه باعث منعکس کردن امواج و ایجاد جرقه و صدمه زدن به د ستگاه می‌گردد. در پوش آلمینیومی را قبل از گرم کردن باید با درپوش پلاستیکی مخصوص عوض کرد.

۲- ز گرم کردن ظروف کاملاً در بسته، خشک کردن کاغذ و پارچه توسط دستگاه اجتناب نمائید. مایعات باید در ظرف درب دار یا روکش دار گرم شوند.

۳- در حین گرم کردن مایعات در مایکروویو،مایع باید کنترل و بازدید گردد و در صورت نیاز حتماً هم زده شود تا سر نرود.

٤- برای خارج کردن ظروف گرم شده توسط دستگاه حتما باید از دستکش یا دستگیره پارچه‌ای استفاده نمود.

۵- پس از گرم کردن مایعات وخاموش کردن دستگاه چند دقیقه صبر نمایید تا حرارت آن یکنواخت شود و سپس با احتیاط آن را از دستگاه خارج نمایید.

٦- درب دستگاه قبل از شروع به کار باید کاملاً بسته باشد و از کار کردن دستگاه با درب باز یا نیمه باز جداً خودداری شود.

۷- در صورتی که در اثر اشتباه دستگاه بدون بار کار نماید، برق آن به طور خودکار قطع می‌گردد. در این صورت حداقل نیم ساعت دستگاه را روشن نکنید.

۸- گر از کیسه نایلونی برای گرم کردن جسمی استفاده می نمایید، دقت فرمایید که منافذی برای خروج بخار آب در کیسه ایجاد نمایید.

۹- کلیدها را آرام و تک به تک فشار دهید هرگز به طور همزمان چند کلید را باهم فشار ندهید.

۱۰- هیچگاه دستگاه را بدون سینی استفاده ننمایید.

۱۱- سطوح داخلی و خارجی، درب و نوارهای حاشیه و سینی گردان و غلطاگر را باید همواره تمیز نگهداشت زیرا در صورت آلودگی دستگاه به مواد شیمیایی و حتی مواد پاک کننده کارایی آن پایین می‌آید، لذا با دستمال مرطوب و آب مقطر دستگاه را تمییز کنید.

۱۲- فقط از ظروف پلاستیکی مقاوم مایکروویو استفاده شود.

۱۳- برای جلوگیری از سر رفتن مایعات از ظروفی استفاده شود که دو برابر حجم مایعات باشد و در صورت امکان قدرت کمتری برای به جوش آوردن استفاده شود.

نظافت دستگاه

برای برطرف کردن لکه‌ها و جرمها از داخل مایکروویو،حدود ۱ لیتر آب در یک ظرف شیشه‌ای قرار داده و دستگاه را به مدت ٦ تا ۸ دقیقه با بالاترین قدرت روشن نمایید. آب به جوش می‌آید و بخار آن باعث می‌شود که لکه‌ها و جرمها نرم شده و به راحتی برطرف شوند. این کار باعث می‌شود که بوی نامطبوع که در اثر گرم کردن بعضی مایعات در داخل دستگاه ایجاد می‌گردد برطرف گردد. مایعات نیز نباید بری روی سینی و داخل محفظه ریخته شوند وبرای شستشو دستگاه نیز حتماً آب را در یک ظرف ریخته و سپس از آن بجوشانید.

مشکلات احتمالی کار با دستگاه مایکروویو

اشکال	توصیه و راه حل
تراکم بخار در داخل دستگاه جریان هوا در اطراف درب و پوشش خارجی انعکاس نور از اطراف درب و پوشش خارجی آزاد شدن بخار از اطراف درب و یا منافذ	طبیعی است
در هنگام فشار دادن کلید <start> دستگاه کار نمی‌کند	از بسته بودن درب دستگاه اطمینان یابید
امکان وارد کردن هیچ تنظیمی نیست	شتباهاً برای توقف موقت کلید <stop> را فشار داده‌اید کلید <Reset> را فشار دهید تا برنامه تنظیمی کاملا

	لغو شود.
شنیدن صدای اضافه یا جرقه	آیا ظروف دارای تزئینات فلزی است؟ آیا ظروف فلزی در دستگاه باقی نمانده است ؟ آیا فویل آلومینیومی در مجاورت دیواره‌ها قرار دارد.

نکاتی در ارتباط با توزین و استفاده از دستگاه ترازو:

برای تهیه مواد ومحلولهای مربوط به آزمایش نیاز به توزین دقیق موادی است که مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به محدودهٔ دقت ترازو، دو ترازو در آزمایشگاه وجود دارد ترازوی غیر حساس که تا حد ۰/۰۱gr وترازوی حساس که تا ۰/۰۰۱mg را وزن می‌کند.

محدودهٔ وزن ترازو

در هنگام توزین به محدوده وزن ترازو دقت کنید. برای توزین وزن‌های بیش از ۱gr از ترازوی حساس وبرای توزین وزن‌های کمتر از ۰/۰۱gr از ترازوی غیر حساس استفاده نکنید.

انتخاب موقعیت مناسب برای ترازو

سطحی که ترازو روی آن قرار می‌گیرد بایستی تا جای ممکن افقی باشد.

مکان قرار گیری ترازو در معرض نور مستقیم خورشید نباشد.

تغییرات درجه حرارت در این مکان گسترده نباشد.

در جهت جریان شدید هوا قرار نگیرد.

تراز کردن ترازو:

بعد از هر جابجایی بایستی ترازو را تراز کرد. صفحه تراز دو دایره است که در مورد ترازوی حساس در جلو و در مورد ترازوی غیر حساس در عقب ترازو قرار دارد در حالت بالانس دایره کوچک باید در وسط دایرهٔ بزرگتر قرار گیرد که این عمل توسط پیچ‌های بالانس صورت می‌گیرد.

طرز جابجا کردن ترازو:(حتی الامکان از جابجاکردن ترازو خوداری نمایید و در صورت ضرورت زیر نظر کارشناس آزمایشگاه صورت گیرد)

دو دست خویش را در جلو وعقب ترازو جای دهید و آن را جابجا کنید (یعنی از سمت عقب و سمت کلید (ReZero

جابجایی نبایستی از دو پهلوی ترازو صورت گیرد.

نظافت ترازو:

بعد از هر توزین بایستی صفحه توزین ترازو پاک شود و حتی الامکان اطمینان داشت که بین کفه ترازو و کفه نگهدارنده ترازو ماده‌ای ریخته نشده باشد زیرا وجود هر نوع جسم خارجی بسیار کوچک منجر به خطای ترازو در خواندن وزن می‌گردد. استفاده از حلال‌های آلی نظیر اتانول برای تمیز کردن ترازو توصیه نمی‌شود. برای پاک کردن ترازو از آب و شوینده‌ها استفاده کنید.

طرز کالیبره کردن ترازو:

قبل از استفاده از ترازو برای اولین بار یا هر چند مدت یکبار ترازو بایستی کالیبره شود.

کلیه Control bar تا صفحه نمایش روشن شود، با ادامه فشار نشانه cal ظاهر می‌شود.

برای کالیبره کردن وزنه ۱۰۰۰gr نیاز است وزنه را روی ترازو قراردهید. وزن وزنه روی صفحه نمایش ظاهر می‌شود.

فوراً وزنه را بر دارید، بعد از برداشتن وزنه (...) ظاهر می‌شود.

زمانیکه صفر روی صفحه نمایش مشخص شود، ترازو کالیبر شده است.

خاموش کردن دستگاه:

برای خاموش کردن ترازو کلید on/off را کمی به سمت بالا بیاورید. بعد از این عمل ترازو روی Stand by قرار می‌گیرد.

نکات ایمنی کار با اتوکلاو:

اتوکلاو دستگاهی است که با استفاده از بخار آب تحت فشار عمل استریلیزاسیون را انجام می‌دهد. در هنگام کار با این دستگاه به نکات زیر توجه نمایید :

جهت جلوگیری از تشکیل رسوب در دستگاه اتوکلاو، از آب مقطر استفاده نمایید.

سطح آب درون دستگاه نباید از انتهای پایین دیگ بالاتر رود. آب باید بر رئی المنتها قرار گیرد.

پیچهای درب را باید کاملا محکم بست، برای این منظور باید پیچهای روبروی هم بسته شود تا درب دستگاه به طور یکنواخت محکم شده و بخار آب از آن خارج نشود.

استفاده از دماهای بیشتر از میزان لازم ومدت زمان طولانی‌تر تفاوتی در نتیجه حاصل ندارد. بهتر است از دما و زمانی که طبق دستورالعمل لازم است پیروی گردد. به طور معمول برای استریلیزاسیون محلولها, تیپها و ویالهای آلوده به DNA ۲۰ دقیقه دمای ۱۲۱ درجه کافی است برای وسایل و مواد آلوده به RNA ٤٥ دقیقه دمای ۱۲۱ درجه و صورت اطمینان بیشتر تکرار این برنامه کافی می‌باشد.

ظروف دارای محلول را نباید پر کرد و حداقل $\frac{1}{3}$ ظرف باید خالی باشد.

درب ظروف، مخصوصاً آنهایی که حاوی محلول هستند را کاملا نبندید، بلکه مقداری آن را شل نموده تا بخار آب ایجاد شده از آن خارج گردد.

پس از اتمام زمان لازم برای استریل کردن نمونه‌ها، جهت باز کردن درب دستگاه بصورت زیر عمل کنید :

منبع حرارت را خاموش کنید و دریچه خروج بخار را باز نمائید (دریچه خروج بخار را آهسته باز کنید مخصوصاً اگر محلول داخل اتوکلاو دارید این عمل خیلی به آهستگی باید انجام گیرد) تا فشار داخل دستگاه به صفر برسد و پس از آن درب دستگاه را باز نمایید.

پس از استریل شیشه جات و یا لوله اپندرف باید مواد مورد نیاز را در آون خشک کرد(۱ الي ۳ ساعت در دمای ۸۰ درجه).

نکات ایمنی کار با دستگاه آون:

آون یا فور دستگاهی است که به کمک آن می‌توان درجه حرارتهای مختلف، مخصوصاً دماهای بالا جهت ضد عفونی کردن وسایل آزمایشگاهی ایجاد نمود.

از ریختن هر نوع مایعات در داخل دستگاه خودداری نمایید و در صورتی که این اتفاق افتاد، بلافاصله دستگاه را از برق کشیده و با پارچه نخی مرطوب سینی‌ها و جداره‌ها را پاک نمایید.

هنگامی که دستگاه روشن است از حرکت دادن آن خودداری نمایید.

دستگاه باید بر روی سطح صاف قرار گیرد.

حتماً توجه داشته باشید که در هنگام کار با دستگاه درب آن بسته باشد.

بهتر است پس از ضدعفونی کردن وسایل آزمایشگاهی مدتی صبر نمایید تا دمای وسایل کاهش یابد. در صورتی که می‌خواهید وسایلی که هنوز داغ هستند، از آون خارج نمایید، حتماً از دستکش محافظ استفاده نمایید و هنگام انتقال وسایل آنها را در یک سینی گذاشته و جابجا نمایید.

برای ضدعفونی کردن وسایل حتماً به حجم مفید دستگاه توجه نموده و از قرار دادن وسایل بیش از ظرفیت دستگاه خودداری نمایید. در این وضعیت ممکن است وسایل کاملاً استریل نگردند.

پس از تنظیم درجه حرارت دستگاه جهت اطمینان از عدم تغییر درجه تنظیم شده درجه تنظیم حرارت را با پیچ مخصوص آن قفل نمایید.

از قرار دادن وسایل پلاستیکی در آون خودداری کنید.

نکات ایمنی و نحوه کار با آون هیبرایداسیون

آون هیبریداسیون دستگاهی است که همزمان با ایجاد دمای لازم و حرکت دورانی، شرایط را برای واکنشهای دو رگه سازی مهیا می‌سازد.

مکان دستگاه :

دستگاه باید در مکانی قرار گیرد که در اطراف آن فضای کافی برای کار با آن وجود داشته باشد.

- چون درب دستگاه رو به بالا باز می‌شود، بالای آن به اندازه‌ای که درب دستگاه به طرف بالا باز می‌شود، نباید مانعی قرار گرفته باشد.

دستگاه باید در مکانی صاف قرار گرفته و ترازی که پشت آن قرار دارد، تنظیم گردد.

نحوه کار با دستگاه :

غشاء و محلولهای مربوط به واکنش دو رگه سازی را درون لوله‌ای مخصوص قرار دهید.

لوله ها را در سبد چرخنده قرار دهید وآن را درون محفظه دستگاه بگذارید.

پیچ تنظیم سرعت چرخش و دما را در پایین‌ترین میزان قرار دهید.

دستگاه را روشن کنید.

کلید مربوط به دستگاه چرخنده را روشن کرده ومیزان چرخش با پیچ کنترل آن را تنظیم کنید.

دما را به حد نیاز افزایش دهید.

پیچ تنظیم دمای ایمنی را چند درجه بیشتر از دمایی که موردنظرتان است، برای اطمینان از عدم افزایش دمای بیرویه تنظیم کنید.

نکاتی دیگر پیرامون کار با دستگاه آون هیبریداسیون

لازم است که درب لوله‌های مخصوص کاملاً محکم شود و از بیرون ریختن مایعات جلوگیری شود. درصورتی که در کاملاً محکم نمی‌شود و مایعات از آن خارج می‌گردد حتماً باید واشر و در صورت لزوم لوله جدیدی مورد استفاده قرار گیرد.

۱۰ تا ۱۵ دقیقه پس از قرار دادن لوله‌ها در دمای ۶۰ تا ۶۸ درجه، پس از قطع کردن چرخش دستگاه، درب لوله‌ها را کمی باز نمایید تا بخار آب ایجاد شده از آن خارج شود. سپس دوباره درب آنها را ببندید و درون دستگاه قرار دهید.

موقع قرار دادن لوله‌ها در سبد چرخنده حتماً باید تقارن حفظ شود، اگر از یک لوله استفاده می‌کنید آن را در وسط سبد، و اگر از دو لوله استفاده می‌کنید، آنها را روبروی هم قرار دهید.

از ریخته شدن محلول در سینی ثابت دستگاه جلوگیری نمایید. در صورت آلوده شدن دستگاه با مایعات، پس از خاموش کردن دستگاه، آن را با پارچه نرم که سایش ایجاد نکند، تمیز نمایید.

دستگاه را بدون بستن پوشش به کار نیندازید.

بعد از اتصال دستگاه به برق , از دست زدن به قسمت های باز دستگاه خودداری نمایید.

از به کار انداختن دستگاه در محیطهای مرطوب خودداری کنید.

سطح دستگاه را تمیز وخشک نگهدارید.

الکتروفورز:

تعریف : به حرکت یونهای کوچک و مولکولهای باردار در محلول که تحت تاثیر میدان الکتریکی انجام می‌گیرد، الکتروفورز گفته می‌شود. میزان حرکت ذرات بستگی به اندازه و شکل و مقدار بار مولکول، جریان الکتریکی و مقاومت محیط دارد.

الکتروفورز پروتئین‌ها

محیطهای زمینه برای الکتروفورز پروتئین‌ها:

کاغذ، ستات سلولز و موادی که بصورت لایه‌های نازک استفاده می‌شوند که جداسازی بر اساس بار الکتریکی است.

ژل‌های آگارز، نشاسته و پلی اکریلامید که جداسازی بر اساس اندازه مولکول و بار الکتریکی است.

ژل آگارز

جداسازی بر اساس بار الکتریکی است.

مولکولهای بزرگتر مانند اسیدهای نوکلئیک و نوکلئوپروتئینها را هم تفکیک‌می‌کند.

ژل نشاسته

قطر منافذ ژل کم است.

جداسازی بر اساس اندازه مولکولی است.

کیفیت نشاسته بسیار مهم است و باید خالص باشد.

ژل پلی‌اکریلامید

قطر منافذ ژل مشابه اندازه پروتئینها است.

از نظر شیمیایی خنثی است.

شفاف و بیرنگ است.

جداسازی بر اساس اندازه مولکول انجام می‌گیرد.

پلی مری از مونومرهای اکریلامید است که توسط $N' - N$ متیلن بیس اکریلامید به هم اتصال متقاطع دارند.

قطر منافذ، نرمی و شفافیت ژل بستگی به غلظت بیس اکریلامید دارد.

آمونیم پرسولفات (APS)عامل پلیمریز کننده بوده و TEMED تسریع کننده(کاتالیزور) است.

ریبوفلاوین پلی مریز کننده و TEMED تسریع کننده (کاتالیزور) ست.

انواع دستگاههای الکتروفورز:

ژل لوله‌ای tube get

ژل صفحه‌ای Slab get با قطر ۱/۵ - ۰/۷۵ میلی‌متر

ژل صفحه‌ای نسبت به لوله‌ای ارجحیت دارد چون در ژل صفحه‌ای تمام نمونه‌ها و مارکرها در شرایط یکسانی تفکیک می‌شوند وحرارت ایجاد شده در تمام سطح ژل پراکنده شده و تغییر شکل بندها کمتر است. به علاوه زمان کمتری برای تهیه آن لازم است.

انواع سیستم‌های بافری

-سیستم Dissociating: در این سیستم تمام پروتئین‌ها به زیر واحدهای پلی‌پپتیدی جدا می‌شوند.

عواملی که در این سیستم‌ها (در ژل و بافرها) جهت جدا کردن زیر واحدها استفاده می‌شوند به دو گروه هستند :

۱- اوره ۸ مولار که باعث شکستن پیوندهای هیدروژنی پروتئین می‌شود و مرکاپتواتانل که پیوندهای دی سولفیدی پروتئین را می‌شکند. در این سیستم حرکت در ژل بر اساس وزن و بار الکتریکی است و دقت کمتری در تعیین وزن مولکولی وجود دارد.

۲- SDS که باعث تشکیل کمپلکسهای پلی پپتید ـ SDS شده و به پلی‌پپتید بار منفی می‌دهد و مرکاپتواتانل که پیوندهای دی‌سولفیدی پروتئین را می‌شکند. در این سیستم حرکت در ژل بر اساس وزن ملکولی بوده و دقت آن بیشتر است.

- سیستم Non-Dissociating : در این سیستم پروتئینها دست نخورده و طبیعی (native) تفکیک می‌شوند. شکل فضایی و فعالیت بیولوژیک پروتئین حفظ می‌شود.

جداسازی بر اساس وزن ملکولی و بار الکتریکی است.

- سیستمContinuous : یونهای بافری مشابهی در نمونه، ژل ومخزن الکترودها وجود دارد وهمه pH یکسانی دارند. ژل یکپارچه بوده و نمونه مستقیما در ژل Resolving وارد می‌شود.

- سیستم Discontinuous : یونهای بافری متفاوتی در نمونه، ژل و مخزن الکترودها وجود دارد و pH آنها متفاوت است. ژل دو قسمت دارد. نمونه ابتدا وارد ژل Stacking که منافذ بزرگی دارد می‌شود و پس از متمرکز و متراکم شدن در آن وارد ژل Resolving با منافذ کوچکتر می‌شود.

مواد مورد استفاده:

- اکریلامید و بیس اکریلامید : این مواد نوروتوکسین قوی هستند. هنگام کار با آنها حتماً باید دستکش و ماسک استفاده کرد. هر چند که پس از پلی مریزه شدن بی خطرهستند اما هیچگاه ژل را با دست بدون دستکش نگیرید چون احتمال اینکه مونومرهای پلی مریزه نشده هنوز در ژل باشند وجود دارد. محلول ذخیره در ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲-۱ ماه پایدار است(در تاریکی). در مدت طولانی‌تر مونومرهای اکریلامید، اسید اکریلیک وآمونیوم, آزاد می‌کنند.

SDS: نوروتوکسین قوی است هنگام کار باید از دستکش و ماسک استفاده کرد محلول آن در یخچال بلوری است اما در دمای اتاق مجدداً مایع می‌شود(محلول آن را در دمای اتاق نگهداری کنید).

اوره : محلول آن بهتر است که تازه تهیه شود چون با گذشت زمان مشتقات خاصی تولید می‌شود که بر بار الکتریکی پروتئین‌ها موثر است(محلول آن را مي توان ماهها نگهداری کرد).

TEMED : در ٤ درجه سانتی‌گراد و تاریکی نگه‌داری می‌شود.

آمونیوم پرسولفات (APS) : چون بلافاصله پس از افزودن آب به پودر آن رادیکال‌های آزاد تولید می‌شود باید محلول تازه تهیه شده آن استفاده شود. در مورد ژل های native و Continuous برای خروج رادیکال‌های اضافی از ژل و جلوگیری از اثر آنها بر پروتئین بیش از بردن نمونه بر روی ژل باید چند دقیقه به دستگاه مولد برق وصل شود.

نکات مهم در تهیه ژل:

- اطمینان از تمیز بودن شیشه‌ها مراحل شستشو به ترتیب عبارتند از :

Spacer ها باید همه قطر یکسان داشته و مشابه شانه باشند.

شیشه‌ها به یکدیگر و به تانک توسط آگار، و یا چسب مخصوص چسبانده می‌شوند وازلین توصیه نمی‌شود.

Degas کردن ژل که پیش از فزودن عامل پلیمریزه کننده انجام می‌گیرد چون اکسیژن مانع پلیمریزه شدن می‌شود.

ریختن ایزوبوتانل بر روی ژل Resolving به منظور عدم تماس ژل با اکسیژن هوا و نیز صاف شدن ژل انجام می گیرد.

بهتر است که ژل Resolving ۲ الی ۳ ساعت در دمای اتاق بماند تا پلیمری شدن کامل شود و بعد ژل Stacking ریخته شود.

نکات مهم در بردن نمونه در ژل:

مقدار SDS باید کافي باشد (برای ۱ گرم پروتئین ۱/٤ گرم SDS) تا بار تمام پلی‌پپتیدها منفی شود.

جوشاندن نمونه در بافر باید کافی باشدتا تمام پروتئین‌ها راسرشت (denature) شوند(۱۰ دقیقه در دمای ۹۲ درجه).

ذره نامحلول در نمونه نباید باشد. باید نمونه سانتریفوژ شده(۲ دقیقه ،rpm ۱۳۰۰۰) و محلول رویی در ژل برده شود.

مقدارنمونه Over load یا Under load نباشد چون این امر موجب تغییر محل بند ورود به چاهک کناری و ظاهر نشدن بند می‌شود. مقدار ۲۵-۱ میکروگرم برای پلی‌پپتید و ۱۰۰-۵۰ میکروگرم برای مخلوط پروتئینی در هر چاهک کافی است حجم نیز نباید به حدی باشد که از چاهک خارج شود.

بردن نمونه در چاهک از فاصله ۲-۱ میلي‌متری از سطح چاهک انجام شود.

نکات مهم در برقراری اتصال به منبع تولید جریان:

حباب هوای زیر ژل باید خارج شود چون مانع برقراری جریان بین ژل و بافر می‌شود.

برای SDS-PAGE و پروتئین‌های با بار منفی آند (+) به مخزن پائین و کاتد(-) به مخزن بالا وصل می‌شود.

در حین کار می‌توان از ولتاژ ثابت و یا شدت جریان ثابت استفاده کرد اما ولتاژ ثابت توصیه می‌شود.

مولد جریان را پس از اتصال ژل به دستگاه روشن کرده و ولتاژ یا جریان را از صفر افزایش دهید. هیچگاه ژل را به مولد روشن وصل نکنید.

معمولا ولتاژ در ژل Stacking کمتر و در ژل Resolving زیاد می‌شود.

توجه کنید :

افزایش ولتاژ← افزایش جریان← افزایش حرارت

افزایش جریان←فزایش سرعت حرکت ← کاهش زمان الکتروفورز← کاهش تفکیک بندها

کاهش جریان ← کاهش سرعت حرکت ← افزایش زمان الکتروفورز← افزایش تفکیک بندها

افزایش زمان الکتروفورز:

وقتی جریان زیاد باشد حرارت زیاد نیز افزایش می‌یابد. در این حالت دمای وسط ژل بیشتر از کناره‌ها بوده و بندها به شکل نیم دایره دیده می‌شوند. به علاوه پروتئینهای حساس نیز غیر فعال می‌شوند .

کاهش قدرت یونی بافر باعث بهتر run شدن می شود.

نازک بودن ژل (میلی‌متر ۱/۵ – ۰/۷۵)

اگر با جریان زیاد کارکرد بهتر است از دستگاه خنک کننده استفاده کرد.

در مورد پروتئینهای native ژل ٤-۰ درجه سانتی‌گراد رانده می‌شود.

الکتروفورز مولکول DNA:

تعریف : در محیطی با PH خنثی به حرکت مولکول DNA با بار منفی (به علت فسفات) از کاتد (-) به سمت آند (+) گفته می‌شود.

محیط‌های انجام الکتروفورز: الکتروفورز DNA به طور عمودی یا افقی و در ژل‌های پلی‌اکریلامید، عمودی بوده و برای جدا کردن قطعات ٦(ژل ۲۰%) تا ۱۰۰۰(ژل ۳%) جفت بازی بکار می‌رود.

- ژل آگارز افقی بوده و برای جدا کردن قطعات ۷۰(ژل ۳%) تا ۸۰۰۰۰۰(ژل ۰/۱%) جفت بازی به کار می‌رود.

بافرها: معمولاً از بافر بورات (TBE) استفاده می‌شود. بافرهای استات یا فسفات هم به کار می‌روند.

جهت راسرشت کردن DNA از بافرهای حاوی اوره، NaOH و متیل مرکوریک هیدروکساید استفاده می‌شود اما :

NaOH باعث دآمینه شدن پلی اکریلامید می‌شود.

متیل مرکوریک هیدروکساید مانع پلیمریزه شدن پلی اکریلامید می‌شود.

اوره بر بستن آگارز اثر دارد.

قطر مناسب ژل آگارز ۳ میلی‌متر و پلی‌اکریلامید ۱ میلی‌متر است.

پلی اکریلامید رقیق شکننده است و می‌توان برای استحکام به آن مقداری آگارز اضافه کرد.

بردن نمونه در ژل (Loading)

اندازه چاهک

اندازه قطعه هر چه قطعه DNA بزرگتر باشد مقدار کمتری باید روی ژل برد.

پراکندگی اندازه قطعات DNA هر چه پراکندگی کمتری داشته باشند باید مقدار بیشتری روی ژل برد.

ولتاژ بالا که موجب تمایز کمتری در قطعات می‌شود .

شرایط الکتروفورز :

معمولاً در دمای آزمایشگاه انجام می‌گیرد.

هر چه ولتاژ بالاتر باشد حرارت ایجاد شد و در نتیجه کشیدگی در بندها بیشتر خواهد بود.

با افزایش غلظت بافر شدت جریان نیز کاهش یافته وگرمای تولید شده کم می‌شود.

قطعات بزرگ با کاهش ولتاژ و افزایش زمان بهتر تفکیک می‌شوند.

قطعات کوچک با ولتاژ بالا وکاهش زمان بهتر تفکیک می‌شوند.

معمولاً ولتاژ به کار رفته ۱۰-۱ ولت به ازای هر سانتی‌متر از طول ژل می‌باشد.

همواره باید تعادلی بین غلظت، طول ژل، زمان و ولتاژ برقرار شود.

نکات مهم

ژل افقی حتماً باید روی سطوح کاملاً صاف تهیه شود.

شیشه‌های مورد استفاده در تهیه ژل باید ابتدا با آب مقطر و سپس با اتانل شسته و تمیز شوند.

ژل پلی‌اکریلامید باید پیش از افزودن عوامل پلیمریزه کننده degas شود.

به ژل‌های رقیق پلی‌کریلامید مقداری آگارز اضافه می‌شود تا استحکام داشته باشد.

اگر ژل آگارز بارها جوشانده و استفاده شود تغلیظ می‌گردد و بافر آن نیز غلیظ می‌شود بهتر است که یا در مقادیر کم تهیه شود و یا مقداری آب (نه بافر) به آن اضافه گردد.

پیش از هر بار استفاده از تانک افقی بهتر است بافر آن را به هم زد تا یونها بطور یکنواخت در آن پراکنده شوند.

اگر به هنگام خارج کردن شانه از درون ژل روی آنرا بافر پوشانده باشد شانه راحت‌تر خارج می‌شود.

هیچگاه به دستگاه مولد برق که روشن است سیم‌های تانک را وصل نکنید بلکه ابتدا دستگاه را خاموش کرده و سپس سیم‌ها را وصل نموده و ولتاژ را بالا ببرید.

هیچگاه هنگام برقراری جریان انگشت خود را درون بافر وارد نکنید چون امکان برق گرفتگی وجود دارد.

هنگام رنگ‌آمیزی ژل مراقب اتیدیم بروماید باشید زیرا موتاژن بسیار قوی است.

الکتروفورز RNA

تعریف : حرکت مولکول RNA که دارای بار منفی است به سمت آند.

در مورد عوامل موثر در الکتروفورز RNA به بخش الکتروفورز DNA مراجعه شود.

علاوه بر موارد ذکر شده در بخش الکتروفورز DNA توجه به نکات زیر در مورد الکتروفورز RNA ضروری است :

مولکول RNA :دارای ساختارهای ثانویه است از جمله بخشهای سنجاق سری و نواحی مکمل در تک رشته که دو رشته‌ها را می‌سازند (RNA). ین عوامل بر حرکت RNA بر روی ژل اثر می‌گذارند.

به دلیل وجود ساختارهای ثانویه RNA را پیش از بردن در ژل واسرشت (Denaturation) می‌کنند تا تخمین وزن مولکولی آن صحیح‌تر باشد.

عوامل راسرشت کننده(Denaturation) که استفاده می‌شوند عبارتند از :

فورمامید که بسیار سمی خطرناک است

اوره

متیل مرکوریک هیدروکساید که فقط در ژل آگارز استفاده شده و بسیار سمی و فرار است.

نکات ایمنی کار با منبع تغذیه و الکتروفورز:

منبع تغذیه را در روی یک سطح صاف و در ارتفاع مناسب قرار دهید و در اطراف دستگاه فاصله کافی در نظر گرفته شود تا هوا در گردش بوده وتبادل حرارتی به آسانی صورت پذیرد.

برای تمیز کردن سطوح خارجی دستگاه هیچگاه از دستمال زبر و یا مواد اسیدی یا قلیایی و یا حلالهایی که باعث از بین رفتن رنگ دستگاه می‌گردد استفاده نشود(فقط از آب مقطر استفاده شود).

دقت گردد که آب بر روی دستگاه نریخته و یا دستگاه داخل آب قرار نگیرد. همیشه قبل از تمیز کردن دستگاه دو شاخ آن از پریز برق خارج گردد.

قبل از انجام الکتروفورز دقت گردد که قطبها مثبت و منفی به تانک صحیح متصل شده باشد، سطح بافر در داخل تانک به اندازه کافی باشد و جهت صفحه نمونه صحیح قرار گرفته باشد.

منبع تغذیه دارای ولتاژ بالا بوده که می‌تواند بسیار خطرناک باشد. همیشه به هنگام تمیز کردن دستگاه دقت شود که دو شاخه از پریز برق کشیده شده باشد هرگز در هنگام باز بودن قاب دستگاه از آن استفاده نگردد.

برای خاموش کردن اضطراری دستگاه دو شاخه را از پریز برق خارج و یا توسط کلید POWER دستگاه را خاموش نمائید.

از دستگاه در صورتی استفاده گردد که پریز برق مورد نظر دارای سیم حفاظتی زمین باشد.

سیم‌های رابط تانک و پاور سوپلای (Power supply) را حداقل هر یک ماه یک بار کنترل نمائید. چنانچه به دلایلی (خشک شدن و ترک خوردن در اثر نور آفتاب) روکش عایق آنها صدمه دیده باشد باید این سیم ها تعویض گردند.

دستورالعمل کار با منبع تغذیه جهت الکتروفورز

ولوم‌های دستگاه را کاملاً به طرف چپ پیچانده و آنها را در حالت Min قرار دهید.

توسط کلید POWER دستگاه را روشن نمائید. در این حالت باید نمایشگر ولتاژ مقدار صفر و نمایشگر جریان هم مقدار صفر را نشان دهد. چنانچه حالتی به غیر از موارد فوق مشاهده گردید، به قسمت عیب‌یابی رجوع نمائید.

تانک الکتروفورز را برای انجام آزمایش آماده نمائید و نمونه‌ها را بارگذاری کنید.

بعد از تمام شدن آزمایش ولومهای دستگاه را کاملاً به سمت چپ بچرخانید تا ولتاژ و جریان مقدار حداقل خود (حدود صفر) برسند.

در آخرین مرحله، توسط کلید POWER دستگاه را خاموش نمائید و فیشها را از ترمینالهای پاور سوپلای خارج نمائید.

اشکال	دلیل احتمالی	رفع عیب
۱- بعد از روشن‌کردن دستگاه نمایشگرهای ولتاژ و جریان روشن نمی‌شوند.	دو شاخه دستگاه به پریز برق متصل نشده است.	دو شاخه را به پریز برق متصل نمائید.
با روشن کردن دستگاه نمایشگرهای ولتاژ و جریان	۱- فیوز خروجی سوخته است	آزمایشگاه با مسئول فنی جهت تعویض فیوز خروجی هماهنگی

روشن می‌شوند ولی ولتاژ خروجی با چرخاندن ولومها بالا نمی‌رود و نمایشگر ولتاژ همواره عدد صفر را نشان می‌دهد		نمایند
۳-نمایشگر جریان حتی پس از وصل تانک به دستگاه همچنان صفر نشان می دهد	۱- سیم‌های ارتباطی بین تانک و دستگاه وصل نیستند یا اشکال دارند. ۲- ارتباط بین بافر و نمونه‌های آزمایش قطع شده است (سطح بافر کم است)	۱- سیم‌های ارتباطی را کنترل کنید. ۲- سطح بافر در تانک را کنترل کنید.

سانتریفوژ:

سانتریفوژها بر اساس ویژگی گوناگونی از جمله وزن مولکولی، ساختار فضائی و دانسیته مولکولی و بر مبنای نیروی گریز از مرکز جداسازی بیومولکول‌ها را میسر می‌سازند.

در حال حاضر سانتریفوژهای متعددی موجود هستند که هر یک از آنها بسته به توانائی‌هائی که دارد، می تواند به برخی از نیازهای پژوهشی پاسخ دهد که در ذیل به برخی از آنها پرداخته می‌شود.

اولترا سانتریفوژ (Ultracentrifuge)

این تکنیک برای اولین بار اندازه‌گیری وزن مولکولی بیومولکول‌ها را میسر ساخت. در حال حاضر از این دستگاه برای جداسازی و تخلیص ماکرومولکول‌ها، آنالیز مخلوط‌ها و برای اندازه‌گیری وزن مولکول و قطر مولکول‌ها استفاده می‌گردد. یک بخش اصلی این دستگاه Control Panel می‌باشد در این قسمت دکمه‌هائي جهت انتخاب سرعت، زمان، درجه حرارت و نوع روتور وجود دارد. کلیدهای فعال‌سازی Start,Vacuum,Printer و Stop نیز در این بخش هستند. دکمه‌هائی هم برای وارد کردن اطلاعات عددی وجود دارد. اتاقکی که روتور در آن قرار می‌گیرد Rotor chamber نام دارد که درب آن از جنس استیل بسیار

محکم ساخته شده است. درب تنها در حالتی باز می‌شود که دکمه اصلی دستگاه روشن و خلاء سیستم خاموش باشد. این محفظه از جنس آلومینیوم است که به وسیله یک پوشش مقاوم از جنس اپوکسی پوشیده شده است.

نام گذاری روتورها:

نام گذاری بر اساس نوع روتور، ماکزیمم سرعت مجاز آن و جنس مواد سازنده آن می‌باشد. روتورها به چهار نوع (NV)Near Vertical و (V)Vertical،(Type)Fixed angle,(SW)Swing out تقسیم می‌شوند. برای مثال روتور Type65 یعنی روتور از نوع زاویه ثابت با ماکزیمم سرعت مجاز ۶۵۰۰۰ است. روتورهای Type دارای زاویه ثابت ۳۰-۲۰ نسبت به محور دوران هستند. روتورهای SW در حین حرکت کاملاً افقی قرار می‌گیرند و در روتورهای V لوله‌ها به موازات محور دوران هستند. جنس روتورهای Beckman از نوع آلومینیوم و یا تیتانیوم است . گر تیتانیوم باشد T یا Ti :در نام روتور می‌آید برای مثال SW55Ti.

انتخاب روتور:

انتخاب روتور بسته به حجم نمونه، تعداد نمونه‌هائي که قرار است سانتریفوژ شوند، سایر ذرات، زمان سانتریفوژ مورد نظر، کیفیت تکنیک، روش جداسازی و دستگاهی که در دسترس باشد، می‌باشند. عموماً روتورهای Swinging برای جداسازی بر اساس چگالی استفاده می‌شود که در آنها یک ماده زمینه وقتي به شیبی از چگالی خودش رسید در آن لحظه سرعت حرکت ذره صفر شده و همان جا متوقف می‌شود.

انواع لوله‌های سانتریفوژ:

الف)Polyallomer: کوپلیمری از اتیلن و پروپیلن است. این لوله‌ها هرگز نمی بایستی در زیر ۲°c درجه سانتي گراد سانتریفوژ گردند. لوله‌های پلی آلومر چند نوع هستند :

۱) Thin wall open - top: حتماً می‌بایستی این لوله‌ها با در پوش استفاده کردند و می‌بایستی از محلول پر باشند(۳-۲ میلي‌متر فاصله از لبه).

۲)Quick-Seal : این لوله‌ها در تمام انواع روتورها قابل استفاده هستند. بالای این لوله‌ها با حرارت قابل Seal می‌باشند. کاربرد این لوله‌ها عمدتاً برای مواقعی است که نمونه‌هااحتمال آلودگی به مواد رادیواکتیو، مواد شیمیائی خطرناک و یا به عوامل پاتوژن دارند.

۳) Konical: این لوله‌ها با آدابتورهای Konical قابل استفاده هستند که به منظور بهبود رسوب‌دهی از این نوع لوله‌ها استفاده می‌گردد.

ب) clear–Ultra : این لوله‌ها دارای دیواره‌های بسیار نازک و شفاف هستند که دو نوع Quick -Seal Open -top از آن موجود است. به لحاظ شفافیت زیاد دیواره این لوله‌ها، محل باندها به خوبی قابل رؤیت هستند. غیر قابل اتوکلاو هستند و هرگز برای محلول‌های pH>8 توصیه نمی‌شوند. این لوله‌ها در محدوده دمائي ۲۰-٤ درجه مناسب کار هستند.

ج)Polycarbonate : لوله‌هائی بسیار محکم، خشک، غیر قابل انعطاف و قابل اتوکلاو هستند که البته اتوکلاو و عمر آنها را کم می‌کند. این لوله‌ها به pH>9 حساس می‌باشند.

د) Stainless Steal: مقاوم به حلال‌های آلی و حرارت هستند . به سانتریفوژ در دمای بالا،فشار زیاد و زمان سانتریفوژ بالا مقاوم می‌باشند.

هـ)Polypropylene: از نظر ظاهر کمی کدر هستند و قابل استفاده مجدد می‌باشند مگر اینکه در حین سانتریفوژ تغییر شکل یافته باشند.

ی)Pyrex: قابل استفاده مجدد هستند مگر اینکه علائمی از خراشیدگی در آنها مشاهده شود. به طیف وسیعی از مواد و محلول ها مقاوم هستند.

نکاتی در رابطه با دستگاه اولتراسانتریفوژ:

۱- بسته به هدف آزمایش،نوع روتور را (اعم از Vertical ,Fixed angle ,Swing out) مناسب انتخاب نمائید.

۲- بهترین راه تفکیک بیومولکول‌ها ازهم (پروتئین ، RNA و DNA) به لحاظ تفاوت چگالی قابل توجهی که از هم دارند، استفاده از گرادیانت سدیم کلراید و سزیم کلرید می‌باشد.

۳- دستگاه اولتراسانتریفوژ در طیف حرارتی صفر تا چهل درجه سانتی‌گراد قابل استفاده است. در صورتی که در برنامه دما داده نشود، Default دمائی آن ۲۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

۴- Accel and Decel Time زمان مورد نظر برای بالا رفتن و پایین آمدن سرعت را تعیین می‌کند اعداد ۹-۱ را می‌توان انتخاب کرد که ٦-۲ دقیقه زمان رسیدن به سرعت مورد نظر و زمان کاهش آن در پایان سانتریفوژ می‌باشد.

۵- برای توقف هر برنامه اولترا، به هر دلیلی ، دکمه Stop را باید فشار دهید.

٦- اینکه run چگونه به اتمام برسد بسته به نوع mode زمانی است که انتخاب شده است. اگر مد Time انتخاب شده باشد ک رأس زمان مقرر سرعت, شروع به کاهش می‌کند ولی در مد Hold، کاربر خودش باید دکمه Stop را فشار دهد. چون زمان نامتناهی است.

۷- در هنگام Precool و Preheat خلاء دستگاه شروع به کار می‌کند و درب دستگاه قفل می‌گردد.

۸- اگر از شیب سدیم کلراید و یا سوکروز استفاده می‌کنید برای تهیه لوله بالانس نیز بایستی از ماده ای با همان حدود چگالی استفاده گردد.

ترجیحاً در هنگام کار با اولتراسانتریفوژ چون می بایستی لوله‌ها کاملاً پر باشند اگر حجم نمونه محدود است چند راه حل زیر پیشنهاد می‌شود :

الف) نتقال به لوله‌های کوچکتر و تغییر روتور

ب) ستفاده از آداپتور

ج) ستفاده از mineral oil یا هر نوع ماده خنثی دیگر با چگالی کم در سطح نمونه.

۱۰- روتورهای نیاز به نظافت منظم دارند. جهت شستشو از دترجنت‌های ضعیف، ترجیحاً آب و سپس روغن های مخصوص که همراه دستگاه می‌باشد، استفاده گردد. O-ring ها باید در آورده شده و خیلی دقیق شستشو گردند.

۱۱- درصورت مشاهده آلودگی در روتور که به هیچ وجه با هیچ ماده شیمیائی قابل تمیز کردن نباشد امکان اتوکلاو روتور هست ولی تا آنجائی که ممکن است از این کار اجتناب گردد.

۱۲- هر روتور به طور متوسط ۱۰۰۰run(در حدود ۲۵۰۰ساعت) در ماکزیمم سرعت مجازش می‌تواند داشته باشد. بعد از آن بهتر است تا ۹۰% سرعت مجازش استفاده گردد.

نکات ایمنی کار با انواع سانتریفوژ

۱- لوله‌های مقابل هم به طور دقیق بالانس وزنی شده باشند خصوصاً هنگامی که با دستگاه اولتراسانتریفوژ کار می‌شود در حد میلی‌گرم نیز بایستی لوله‌ها بالانس گردند.

۲- متقارن قرار دادن لوله‌ها در روتور بسیار مهم است.

۳- پس از هر بار سانتریفوژ ، کنترل دستگاه از نظر احتمال آلودگی امری ضروری است.

٤- انتخاب سنجیده دستگاه سانتریفوژ و روتور مناسب بر اساس شرایط کار (از نر سرعت، زمان، دما و حجم و تعداد نمونه).

٥- برای تبدیل g به rpm در صورت عدم دسترسی به شعاع دقیق روتور، به مسئول دستگاه جهت اندازه گیری شعاع میانگین (rAV) مراجعه فرمائید.

٦- بسته به نوع حلالی که استفاده می‌شود و دور سانتریفوژ مورد نظر، توجه به جنس لوله ضروری است.

٧- در صورت شنیدن صدای نامتعارف از دستگاه، سریعاً سرعت را به صفر رسانده و به بالانس وزنی لوله‌ها توجه فرمائید.

٨- در ابتدای Setting یک دستگاه سانتریفوژ، تراز دستگاه بایستی بطور دقیق انجام شود و فاصله از دیوارهای مجاور نیز بسیار حائز اهمیت است.

٩- در هنگام روشن بودن سانتریفوژهای یخچال‌دار، چون کمپرسور در حال کار می‌باشد، درب دستگاه حتماً بسته باشد.

١٠- در دستگاه‌هایی که Accel و Decel قابل تنظیم نیستند، کاربر می‌بایستی به آرامی سرعت را بالا ببرد.

١١- تا زمانی که سانتریفوژ به rpm مورد نظر نرسیده است،کنار سانتریفوژ بمانید و در صورت ایجاد صدای غیر عادی یا هر گونه اشکال دیگر در دستگاه، فوراً دکمه Stop را فشار دهید.

١٢- سانتریفوژ نباید در یک محیط دارای خطر یا قابل اشتعال کار کند.

١٣- لطفا هرگز دستگاههای سانتریفوژ رومیزی را از محل خود تکان ندهید.

١٤- اگر بخاطر قطع شدن برق و یا هر گونه اشکال دیگر، درب میکروسانتریفوژ قفل شده و نمونه‌ها در داخل سانتریفوژ جا مانده باشند، باید قفل آن بطور مکانیکی باز شود که برای این منظور با مسئول دستگاه تماس بگیرید.

١٥- اگر مایع وارد روتور یا bucket اولتراسانتریفوژ می‌شود، آن را فوراً خارج کنید. برای این کار فقط عوامل تمیز کننده خنثی و Disinfectantها (مثل اتانول ٧٠ درصد، Extran^{R} neutral) باید استفاده شود. پس از تمیز کردن ،آن را با آب مقطر شسته و کاملا خشک کنید. بطور خاص مایعات قلیایی و محلولهای غلیظ سالین، اجسام aluminum anodized را مورد حمله قرار می‌دهند و نباید برای این سانتریفوژ استفاده شوند.

١٦- در صورت آلودگی و یا شکستن لوله‌ها در سانتریفوژ مسئول دستگاه را آگاه سازید.

۱۷- برای تبدیل rpm و g در سانتریفوژ به یکدیگر از فرمول زیر استفاده کنید.

$g=RCF=1.12r\ (RPM/100)^2$

شعاع روتور بر حسب سانتی‌متر = r

RCF=Relative Centrifugal Force

۱۸- دستگاههای سانتریفوژی که با خلاء کار می‌کنند، اگر خلاء بطور مناسب افزایش نمی‌یابد به چند نکته باید توجه کرد :

الف ـ توجه به O-ring های درب دستگاه از لحاظ سلامت و تمیزی.

ب- چک کردن فضای محفظه روتور از نظر رطوبت اضافی

ج – توجه به O-ringهای درب روتور اگر هیچ یک از موارد فوق مشکلی نداشته باشد، جهت کنترل روغن پمپ خلاء به مسئول دستگاه مراجعه نمائید.

PCR

با ابداع PCR توسط Mullis (برخی از محققین Saiki را مبدع این تکنیک می دانند) تحولات شگرفی در تحقیقات زیست شناسی مولکولی صورت گرفت. اولین واکنش های PCR توسط قطعه klenow fragment آنزیمDNA پلیمراز باکتری E.coli انجام می شد که با توجه به غیرمقاوم بودن آن به حرارت، درهر سیکل پس از هر واسرشت(Denaturation)، افزودن آنزیم ضروری بود. البته این آنزیم حداکثر بازده را برای قطعات تا ۲۰۰ جفت باز دارد ولی برای قطعات بزرگتر چندان مناسب کار نمی کند.

۱- نکات مهم پیشرفت در تکنیک PCR

کشف آنزیم های مقاوم به حرارت نظیر Taq DNA Polymerase و جدا سازی آنها از ارگانیسم های ساکن آبهای گرم.

اختراع دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه ریزی خصوصاً چند بلاکه که توان انجام چندین برنامه را باهم دارند.

استفاده از پلیت های۹۶ خانه ای به جای ویال PCR

تغییر در سیستم های سرد کننده و گرم کننده و کاهش زمان RAMP

کاربرد های تکنیک PCR در عرصه های مختلف بیوتکنولوژی ، مهندسی ژنتیک، جرم شناسی، تشخیص سریع بیماری های عفونی، تشخیص قبل ازتولد امراض ژنتیکی، تجزیه و تحلیل مولکولی نمونه های تاریخي، تعیین جنسیت جنین، تشخیص جهش، سرطان ها وغیره مي باشد.

امروزه ابداع روش های Competive PCR ,Assymetric PCR ,Nested PCR ,RACE PCR, multiplex PCR , RT PCR, ARMs- PCR قابلیت و کاربرد های این تکنیک را بسیار گسترش داده است.

۲- واکنش استاندارد PCR

Standard PCR Rxn mix

Reagent	Volume	Final conc.
Sterile ddH2O	20.7«*l*	_
10x PCR buffer	2.5«*l*	1x
dNTP mix (25Mm each)	0.2«*l*	200«*M* (*each*)
Primer mix (25pmol/µl each primer)	0.4«*l*	0.4«*M* (*each*)
Genomic DNA Template(100*ng* / «*l*)	1«*l*	100*ng* / 25«*l*

۳- نکاتی دررابطه باتهیه واکنش PCR

۳-۱- نگهداشتن ویال برروی یخ درطول زمان افزودن اجزاء واکنش و مخلوط کردن آنها.

۳-۲- تهیه واکنش درزیرجریان هوای یک هود لامینار استریل (:درمواردی که در محل آزمایشگاه ازنوع DNA الگوی مورد نظر کار ما زیاد استفاده می شود)

بهتر است ابتدا آب واکنش درویال ریخته شود.

ترجیحاً پس ازافزودن هریک ازمواد واکنش با آب مخلوط گردد.

به حداقل رساندن شانس اتصال پرایمر به DNA (ترجیحاً DNA الگو آخرین افزودنی قبل از آنزیم باشد)

افزودن آنزیم پلیمراز به عنوان آخرین ماده واکنش.

(درصورت امکان) افزودن آنزیم پس ازاولین مرحله واسرشت(Denaturation)

٤- طراحی یک واکنش اولیه PCR

First Den.	94^{0c}	Optional
Den.	94^{0c}	30-60 sec
Anneal	54^{0c}	30-60 sec
Ext.	72^{0c}	30-90 sec
Final Ext.	72^{0c}	Optional

حال به شرح نکات مربوط به تک تک مواد واکنش PCR می پردازیم.

٥- بافر

بافر معمولی واکنش PCR شامل:

Final Conc. buffer → 1X

10XPCR: 500mM kcl, 100Mm Tris.Hcl(PH=8.3), 15mM $Mgcl_2$

البته گاهی بافر PCR که توسط برخی شرکت های سازنده مواد آزمایشگاهی تهیه می شود واجد بتامرکاپتواتانل, سولفات آمونیم و EDTA می باشد ولی چندان معمول نیست.

گاهی اوقات از یک سری Enhancer ها به منظور تشدید و تقویت واکنش در PCR استفاده می گردد. برای مثال گلیسرول ، BSA, DMSO, Betain, PEG و Spermidine را می توان عنوان کرد.

استفاده از DMSO و گلیسرول در غلظت (v/v) ۱۰-۵% سبب افزایش بازده واکنش و تولید میزان محصول بیشتر می گردد و همچنین سبب اختصاصی شدن واکنش (حذف محصول غیر اختصاصی) می شود. البته استفاده از گلیسرول و DMSO گاهی اوقات نتایج conficl دارد برای برخی واکنش ها تاثیر مثبت بر برخی دیگر تاثیر منفی و گاهی بدون تاثیر است. بنابراین استفاده از این تشدید کننده ها در هر مورد باید مورد آزمایش قرار گیرد.

BSA تا غلظت $0/8 «g/«l$ بازده واکنش PCR را افزایش می دهد هیچ تاثیر مهاری از BSA روی هیچ واکنش PCR تا به حال دیده نشده است.

Vortex بافر قبل از استفاده پس از ذوب کامل ضروری است.

بهترین واکنش PCR به صورت $1xsalt + 200«MeachdNTP1.5mMMgc12$ مي باشد.

غلظت یون منیزیم در اتصال پرایمر به DNA، جدا شدن رشته های الگو از هم، اختصاصی بودن محصول تشکیل پرایمر دایمر، فعالیت و صحت عملکرد آنزیم پلیمر از اهمیت دارد.

افزودن یون منیزیم از ۱/۵ به ۱/۸ Mm و یا حتی بیشتر سبب کاهش stringency هیبریداسیون پرایمر شده اغلب شرایط اتصال پرایمر را به لکوس مورد نظر غیر اختصاصی‌تر مي كند. بنابراین در ایجاد باندهای غیر اختصاصی کمک شایان توجهی دارد.از طرف دیگر غلظت بسیار بالای Mg^{2+} اثر مهاری بر فعالیت آنزیم Taq دارد و میزان حصول را کاهش می دهد بنابراین استفاده از غلظت بهینه یون منیزیم از اهمیت خاصی برخوردار است.

برای ساخت قطعات بزرگتر از 2kb به بیشتر از 2Mm منیزیم نیاز است.

عموماً جفت پرایمرهای سازنده قطعات بلندتر در غلظت نمک Kcl پایین تر و جفت پرایمرهای سازنده قطعات کوتاهتر در شرایط غلظت نمک بالاتر بهتر عمل می کنند.

در رابطه با توالی های با GC کم، با توجه به اینکه هلیکس DNA پایداری کمی پیدا می کند بنابراین ممکن است در دمای Ext رشته های تازه ساخت شده قبل از اینکه آنزیم پلیمراز به طور کامل رشته را بسازد، از الگو جدا شوند در این حالت با افزایش قدرت یونی محیط به میزان M ۱/٦ به اتصال رشته های تازه ساخته شده به الگو کمک می گردد.

٦- چند نکته در مورد DNA الگو و پرایمر:

Nm ۱۰۰-۵۰۰ ز هر یک پرایمر ها در هر واکنش $25-50«l$ میکرولیتری كافي مي‌باشد.

استفاده از مقادیر یکسان از دو پرایمر در واکنش ضروری است (مگر اینکه Assymctric PCR) مورد نظر آزمایش باشد.

طول معمول پرایمرها ۱۸-۲٤ باز است ولی استفاده از پرایمرهای با طول ۳۰-۳۵ باز برای واکنش های multiplex PCR توصیه می شود.

مطلوب است که دو پرایمر طراحی شده دارای Tm نزدیک هم باشند (حداکثر تفاوت 5^{c}) اگر تفاوت Tm دو پرایمر بیش از 5^{c} است با افزایش طول پرایمر با Tm پایین تر این مشکل تا حدی قابل حل است.

بهتر است آغاز و انتهای پرایمر با یک یا دو باز پورین آغاز و خاتمه یابد.

می بایستی توالی پرایمر طراحی شده از نظر تشابه با سایر نقاط ژنومی در برنامه BLAST چک شود. اگر دولکوس بسیار مشابه وجود داشته باشد بهتراست با افزودن ۲-۱ باز در یکی از دو انتهای پرایمر به طوری که باری لکوس بازی مورد نظر اختصاصی گردد طراحی شود.

عمومی ترین فرمول جهت محاسبه Tm پرایمر

$Tm - [(\text{Number of A+T})* 2^0 C+ (\text{Number of G+C}) * 4^0]$

است که معمولاً بهترین دمای Annealing ^{c} ۳-۵ کمتر از Tm پرایمر است.

عموماً در واکنش PCR پرایمر ها در رقابت با محصول مطلوب واکنش هستند. در جهت رفع آنها باید بکوشیم.

توالی پرایمر طوری باشد که موجب ایجاد ساختار ثانویه در آن نشودو توالی به گونه‌ای نباشد که خود پرایمرها با هم چسبیده و دایمر تشکیل دهند.

پرایمرهای حاوی C,G یا GC در انتهای ′۳ از کارایی بالاتری در شروع سنتز برخوردارند.

در واکنش multiplex PCR , DNA الگو سبب کاهش محصول PCR می گردد ولی در واکنش های , ng Single locus ۱-۵۰ دارای نتایج مشابه بوده است.

BSA تا غلظت $0/8«g/«l$ بازده واکنش PCR را افزایش می دهد هیچ تاثیر مهاری از BSA روی هیچ واکنش PCR تا به حال دیده نشده است.

Vortex بافر قبل از از استفاده و پس از ذوب کامل ضروری است.

اگر منبع سلولی استخراج DNA خون است حتماً از ضد انعقاد EDTA به میزان یک میلی گرم در ازای یک میلی‌لیتر خون استفاده کنید. هپارین مهار کننده واکنش PCR است.

استفاده از کنترل مثبت و منفی درواکنش PCR مهم است.

استفاده سنجیده از DNA الگو و پرایمر در واکنش PCR بسیار مهم است بنابراین اندازه‌گیری دقیق جذب و محاسبه غلظت بطور صحیح ضروری است. مولکول اسید نوکلئیک در طول موج ۲۶۰nm و مولکول پروتئین در طول موج‌های ۲۲۰ و ۲۸۰ نانومتر جذب دارند(جذب در ناحیه ۲۲۰ مربوط به کروموفورهای موجود در باندهای پپتیدی و در ۲۸۰ نانومتر در رابطه با گروه‌های جانبی آروماتیک اسیدهای آمینه است. در اصول شیمی فیزیک ارتباط جذب با غلظت محلول یک رابطه خطی است. (لبته تا حدی از غلظت رابطه خطی مشاهده

میشود) معمولاً جذب حدود ۱ و بالاتر حکایت از یک محلول غلیظ می‌کند که خارج از محدوده ارتباط خطی میباشد بهترین رقت وقتی است که جذبی در حدود ۰/۱ را نشان دهد.

لطفا به استانداردهای زیر در محاسبه غلظت توجه نمائید.

ds DNA	OD=1	C=50 «g/ml
SS DNA	OD=1	C=37-38 «g/ml
RNA	OD=1	C=40 «g/ml
oligonucleotide	OD=1	C=33 «g/ml

۷- نکاتی چند در مورد دما و زمان Denaturation & Extension ,Annealing

زمان Annealing ۶۰-۳۰ ثانیه برای هر نوع جفت پرایمری مناسب و کافی است.

دمای Annealing بر اساس Tm جفت پرایمر است.

عموماً از دمای Annealing آغازین C ٥٤ میتوان واکنش PCR را آغاز کرد این دما برای اغلب جفت پرایمرهای با طول ۲۰bp مناسب است. در صورت مشاهده محصول غیر اختصاصی بزرگ، دما را می‌توان افزایش داد.

یک واکنش PCR اپتیمم باید بتواند یک لکوس خاص را بدون ساخت هیچ محصول جانبی غیر اختصاصی تهیه کند. بنابراین انجام annealing در دمای بالا اجازه ساخت جفت‌های DNA-DNA بسیار قطعی را میدهد.

به نظر میآید که زمینه غیر اختصاصی (nonspecific background) مربوط به mispriming است بنابراین مجدداً بابستی دما را تغییر داد تا اتصال DNA الگو به پرایمر به درستی انجام شود.

زمان واسرشت,۶۰-۳۰ ثانیه برای هر نوع DNA الگو کافی است. افزودن زمان واسرشت نفعی برای واکنش ندارد جز اینکه فعالیت و نیمه عمر آنزیم Taq کاهش میدهد.

مرحله واسرشت اولیه(Initial Denaturation) ۵-۲ دقیقه‌ای قبل از شروع سیکل‌های PCR، کمک‌شایانی به بهتر واسرشت شدن DNA الگو می‌کند.

در رابطه با زمان .Ext، یک دقیقه برای طولی در حدود یک کیلو باز مناسب است.

زمان Ext، نهایی ۱۰-۵ دقیقه کمک به تکمیل رشته‌های نیمه تمام می‌کند.

در واکنش‌های multiplex PCR زمان بیشتری برای Ext مورد نیاز است. اگر دو واکنش multiplex با شرایط یکسان را در دو زمان Ext ۱ و ۲ دقیقه انجام دهیم بازده واکنش در ۲ دقیقه بیشتر است ولی افزایش زمان Ext از ۲ به ٤ دقیقه ساخت محصولات کوتاه را به حداقل می‌رساند بنابراین حتی در multiplex زمان Ext از ۲ دقیقه بیشتر توصیه نمی‌گردد.

۸- نکاتی در رابطه با dNTP

گاهی dNTP به صورت پودر در دسترس است که هر یک از نوکلئوتیدها را به تفکیک با غلظت نهائی ۱۰۰Mm تهیه کرده سپس مخلوطی از چهار نوکلئوتید به گونه‌ی که از هر یک از آنها ۲۵Mm در working solution باشد و نهایتاً حجمی از آن در هر واکنش استفاده می‌شود تا به غلظت نهائی M » ۲۰۰ از هر یک از نوکلئوتیدها برسد.

dNTP در مقابل فریز و ذوب متعدد بسیار ناپایدار است بنابراین بهتر است working solution در حجم‌های کم aliquot و در C ۲۰- نگهداری گردد.

پس از ذوب شدن dNTP، حتماً آنرا Spin کنید بی شک تبخیر آب آنها سبب تغییر غلظت خواهد شد.

یک واکنش استاندارد PCR که شامل ۱/۵Mm $MgCl_2$ و M dNTP » ۲۰۰ در حجم ۲۵ میکرولیتر باشد از نظر تئوری توان سنتز ٦/٥-٦ میکروگرم DNA را دارد.

در یك آزمایش در غلظت ثابت ۳Mm از Mg^{2+}،مقادیر متفاوت dNTP ستفاده شده است. بهترین نتیجه برای multiplex PCR (٤٠٠-٢٠٠bp) در حدود (M » ۱۲۰۰-۵۰) بوده است.

آنزیم Taq نیاز به یون منیزیم آزاد دارد نوکلئوتیدها یک شلاتور قوی برای یون‌های منیزیم باشند بنابراین استفاده زیاد از dNTP سبب کاهش یون منیزیم آزاد مورد نیاز آنزیم پلیمراز خواهد شد. بنابراین زیادی میزان dNTP نقش مهاری بر واکنش PCR دارد. در صورت زیاد بودن میزان dNTP به ناچار میزان Mg^{2+} را نیز باید افزایش داد.

۹- نکاتی چند در رابطه با آنزیم DNA پلیمراز

فعالیت آنزیم پس از هر واسرشت حرارتی کاهش می‌یابد.

آنزیم Taq در دمای ۷۰-۸۰C دارای سرعت سنتز ۳۵-۱۰۰N/sec است. سه آنزیم پلیمراز دیگری که به فراوانی در PCR استفاده می‌شوندPfu, vent ,KLF می‌باشند. آنزیم Taq در شرایط دما و غلظت نمک مناسب در هر ۲×۱۰^{٤} نوکلئوتید یک اشتباه انجام می‌دهد.

نیمه عمر پایداری (Thermo stability half life) آنزیم Taq در ۹۵C درجه پائین است در صورتی که pfu و vent مقاومتر هستند. بنابراین برای توالی‌های غنی از GC بهتر است دمای واسرشت به ۹۵C درجه افزایش یافته ونوع آنزیم نیز تغییر یابد.

آنزیم‌ها هرگز نیازی به vortex ندارند به علت اینکه در بافر ذخیره آنها همیشه گلیسرول موجود است که محلول همگن از آنزیم فراهم می‌کند.

بهترین میزان آنزیم Taq ۱u/۲۵ «l است استفاده از مقادیر بسیار پائین آنزیم پلیمراز سبب کاهش محصول نهایی PCR می‌شود. استفاده بیشتر از حد از آنزیم Taq به علت وجود گلیسرول، دو تأثیر منفی در واکنش دارد.

سبب افزایش زمینه (background) در محصول PCR به شکل اسمیر می‌شود.

سبب ساخت محصولات غیر مطلوب می‌گردد.

همواره به غلظت آنزیم استوک توجه فرمائید.

درست در هنگام افزودن آنزیم به واکنش آن را از فریزر خارج کرده و در جعبه یخ نگهداری کرده و سپس بلافاصله به فریزر برگردانید.

۱- ذکر چند نکته در مورد تکنیک PCR

امروز دستگاهی با قابلیت انجام *In situ* PCR بر روی اسلاید ساخته شده است. گاهی انجام یک برنامه PCR در دو ترموسایکلر متفاوت، به جهت اینکه پروفایل دمائی و زمانی متفاوتی دارند، نتایج مختلفی می دهد. اغلب ماشین‌ها بهترین بازده کاری را برای لوله‌های ۰/۲ml با دیواره شفاف و یا پلیت‌های ۹۶ خانه ای دارند بنابراین برای هر دستگاه بایستی شرایط واکنش بهینه گردد.

افزایش حجم واکنش PCR با رعایت غلظت و مقادیر مواد واکنش مشکلی ندارد ولی در هر واکنش PCR با حجم زیاد توصیه نمی‌شود بهتر است aliquot به چند لوله گردد.

برای قطعات PCR کوتاهتر از ٦٠٠ جفت باز شرایط الکتروفورز سریع ٤-٣ ساعت در ژل آگارز ٧-١٥cm در ژل ٢% تفکیک مناسب و باندهای sharp خواهد داد چنین اصول PCR ای اگر در ولتاژ پائین به صورت O/N(١٦-١٤ ساعت) الکتروفورز شود به diffusion بالا، باندها مناسب نخواهد بود.

عموماً در چند سیکل اول، طول قطعه ساخته شده بزرگتر از طول مورد نظر واکنش است تا از روی الگو ساخته میشود ولی کم کم الگوی واکنش، قطعه موردنظر خواهد شد.

گاهي PCR دو مرحلهای مورد نیاز است که مرحله Ext. & Annealing را در هم ادغام میکنند و دمائی حد وسط در نظر میگیرند که عموماً برای قطعات بسیار غنی از GC کاربرد دارد .

بطور بالقوه PCR قادر است با یک کپی از الگو نتیجه بخش باشد پس باید مراقبتهای شدیدی از نظر آلودگی اعمال نمود.

پس از ذوب شدن مواد شرکت کننده در واکنش PCR آنها را ورتکس و SPIN کرده و سپس استفاده نمائید.

وسائل و واکنشگرهای مورد استفاده در PCR جدا از وسائل عمومی آزمایشگاه باشند.

استفاده از نوک سمپلر حاوی فیلتر در برداشتن DNA جهت جلوگیری از ورود آئروسل به پی پت توصیه میشود.

در صورت کنترل واکنش و اطمینان از اشکال واکنش در قسمت DNA الگو احتمال وجود انواع مهارکنندهها نظیر فنل، کلروفرم، دترجنتهای یونی مثل SDS و سارکوسیل ، هپارین،XC ، BPB و داکسی یوریدین در واکنش هست که با رسوب دهی مجدد با اتانل ویا سانتریفوژ اولترافیلتراسیون این مشکل حل میشود.

گاهی انجام ٧- ٥ سیکل در دمای Annealing بالاتر و سپس بقیه سیکلها در دمای پائینتر در کیفیت محصول و تک باند شدن مؤثر است.

گاهی استفاده از پروتکل touch Down ($٠/٥-١\ ^{\circ}c/cycle$) تا حدی که به $٥\ ^{\circ}C$ کمتر از Tm پرایمر برسد در بهبود کیفیت محصول PCR نقش به سزائی داشته است.

یکی از منابع آلودگی آزمایشگاه، بافر موجود در تانک الکتروفورز است چنانچه قطره کوچکی از آن در محیط آزمایشگاه یا اطراف تانک بریزد و خشک شود ذرات آئروسل در فضای آزمایشگاه و سبب مثبت بودن کاذب واکنش PCR خواهد شد.

استفاده از دستکش یکبار مصرف و تعویض آن در طی تهیه واکنش PCR توصیه میشود.

نمونه‌های DNA استخراج شده در فریزر جدا از محل نگهداری کیت‌ها و مواد مربوط به PCR نگهداری شوند.

وجود DNase در مواردی که تعداد نسخه مولکول هدف پائین باشد سبب از بین رفتن DNA و جواب منفی کاذب (برای مثال در تشخیص عوامل عفونی) می‌گردد.

بهتر است DNA پلاسمید و باکتری در $-20^{\circ}C$ نگهداری شوند. DNAها ژنومیک بسیار سنگین در فریزر دگرده می‌شود بنابراین نگهداری آنها در $4^{\circ}C$ بهتر است . نگهداری دراز مدت زیر اتانل یا ایزوپروپانل در $-20^{\circ}C$ و حل کردن در TE توصیه می‌شود.

جدا بودن میز کار استخراج DNA و RNA از میز PCR تأثیر مثبت در بهبود شرایط واکنش PCR دارد.

جدا و دور بودن اتاق UV از محل تهیه واکنش PCR (چون سطح UV حاوی DNA خشک شده و فضای اتاق UV دارای مقداری زیادی آئروسل می‌باشد) نیز توصیه می‌گردد.

۱۱- نکاتی در رابطه با مشاهده باند غیر اختصاصی

- غلظت پرایمر خیلی زیاد است.
- دمای Annealing پائین است خصوصاً در سیکل‌های اول دمای پائین Annealing سبب اتصال غیر اختصاصی پرایمر به الگو می‌گردد.
- می توان غلظت یون منیزیم را کاهش داد
- غلظت dNTP خیلی بالا است.
- دناتوراسیون DNA لگو بطور کامل نیست.
- زمان سیکل‌ها را می‌توان کمی کاهش داد.
- سرعت RAMP خیلی کند است.
- گاهی انجام یک واکنش NESTED PCR باند اضافی را حذف می‌کند.
- بریدن باند مورد نظر از روی ژل آگارز، تخلیص آن و سپس Reamplify آن نیز توصیه می‌گردد.
- در طراحی پرایمر اشکال بوده است.

۱۲- نکاتی در مورد کمبود یا نبود محصول PCR

- ❖ غلظت پرایمر کم است.
- ❖ تعادل وزنی دو پرایمر رعایت نشده است.
- ❖ غلظت DNA الگو بسیار پائین است.
- ❖ غلظت DNA الگو بسیار بالا است . مقدار بسیار زیاد الگو با اتصال به کلیه پرایمرها واکنش را مهار می‌کند.
- ❖ DNA الگو بسیار دگرده شده است.
- ❖ غلظت منیزیم بسیار کم است.
- ❖ میزان dNTP پایین است.
- ❖ تکثیر مجدد (Reamplify) محصول PCR اول 1:1000 – 1:10
- ❖ dNTP دگرده شده است (اجتناب از مکرر فریز و ذوب شدن dNTP)
- ❖ چک کردن DNA الگو با انجام واکنش کنترل مثبت.
- ❖ دمای Annealing خیلی بالاست .
- ❖ فزودن Enhancer به واکنش را می توان امتحان کرد.
- ❖ روغن معدنی، لوله‌های واکنش و یا مواد واکنش آلوده به نوکلئاز هستند.
- ❖ تعداد سیکلها کم بوده است.
- ❖ کنترل صحت عملکرد ترموسایکلر
- ❖ کنترل برنامه داده شده به ترموسایکلر
- ❖ پرایمرهای جدید با طراحی جدید مورد نیاز می‌باشد.

۱۳- مشاهده اسمیر با وزن مولکولی بالا

- ❖ غلظت پرایمر بسیار بالا است.
- ❖ DNA الگو زیاد استفاده شده است.
- ❖ DNA الگو بسیار دگرده شده است.
- ❖ غلظت یون منیزیم بسیار بالا است.
- ❖ غلظت آنزیم بسیار بالاست.

- دما و زمان واسرشت کم است.
- زمان انکوباسیون .Anneal و یا .Ext زیاد است.
- تعداد سیکل‌ها زیاد است.
- نیاز به طراحی پرایمر جدید است.
- کیفیت DNA پایین مي باشد.

۱٤- مشاهده پرایمر دایمر

- نتهاهای $3'$ پرایمرها مکمل هم هستند.
- غلظت پرایمر بالاست.
- غلظت DNA الگو پائین است.
- تعداد سیکل‌ها زیاد است.
- حتیاج به پرایمرهای با طول بلندتر هست.
- دمای Annealing پائین است.

نکات ضروری در هنگام کار با انکوباتورها

- نکوباتورها تا حد امکان باید در نزدیکی هودهای کشت سلولی یا هودهای میکروبی قرار داده شوند.
- انکوباتور را در سطحی مطمئن قرار دهید.
- نکوباتور را بر روی سطحی صاف و در حالت تعادل قرار دهید.
- از قرار دادن انکوباتور در جای مرطوب و خیلی گرم که محل مناسبی برای رشد باکتریها است خودداری کنید . دمای محیط باید بین ۵ تا ٤۰ درجه سانتی گراد بوده و حداکثر رطوبت ۸۰ درصد در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد و یا ۵۰ درصد در دمای ٤۰ درجه سانتی گراد باشد.
- نکوباتور را در نزدیک دربهای اصلی یا جریانات هوائی و هواکش‌ها قرار ندهید.
- در صورت امکان انکوباتور کشت سلولی در اتاق کشت و انکوباتور میکروبی در محل مناسب خود قرار گیرد.

- بعد از مشخص کردن مکان انکوباتور باید تمام محلهای اتصال آب و گاز :ر دستگاه که موجب شوک و صدمه به :ستگاه می‌گردد را کنترل کنید.
- هنگامی که سیلندر متصل می‌باشد از کار کردن با سیفون سیلندر خودداری کنید.
- بعد از وصل کردن تنظیم کننده سیلندر گاز CO_2 ، فشار گاز در مانومتر اولیه (طرف سیلندر گاز) باید در حدود $۲۵۰Kg/cm^2G$ یا ۲٤/٥MPAG و در طرف دیگر ۱۹٦KPAG یا $۲Kg/cm^2G$ باشد.
- هنگامی که درجه حرارت انکوباتور بر روی ۳۷ تنظیم می‌باشد درجه حرارت محیط نباید از ۳۲ درجه بیشتر باشد.
- ز گذاشتن مواد فرار یا قابل اشتعال (اتر، بنزن، الکل، پروپان) در انکوباتور خودداری کنید.
- ز آب تقطیر شده یا خالص برای پرکردن محفظه آب جهت ایجاد رطوبت استفاده کنید. و سطح آب را در محل ذخیره همیشه کنترل شود. استفاده از مقادیر کم سولفات مس و یا ساولون برای جلوگیری از رشد قارچها و کپک‌ها در آب داخل انکوباتور مناسب است.
- ظروف کشت سلول یا پلیت‌های باکتریها را با فاصله از یکدیگر قرار دهید تا جریان هوا به خوبی صورت گیرد، اگر فاصله این ظروف کم باشد تعدیل دما و گاز CO_2 در بین آنها به خوبی صورت نمی‌گیرد.
- همیشه مراقب باشید که درب داخل انکوباتور خوب بسته شده باشد.
- قبل از برداشتن فلاسک‌های کشت سلول یا پلیت‌های باکتریها از دستکش‌های لاتکس استفاده نموده و حتماً دست‌ها را ضد عفونی نمائید.
- برای تمیز کردن دستگاه از ریختن آب روی آن خودداری کنید.
- هنگامی که می‌خواهید انکوباتور را تمیز کنید از برس، اسید، بنزن و تینر استفاده نکنید، این عمل باعث از بین رفتن رنگ دستگاه و صدمه به پوشش آن می‌شود. همچنین قسمت‌های پلاستیکی ممکن است دچار تغییر شکل گردند. هیچوقت از مواد شیمیائی فرار مانند بنزن در قسمت‌های پلاستیکی استفاده نکنید. مواد درجه بهترین انتخاب برای شستشوی دستگاه می‌باشند.

- برای تمیز کردن داخل دستگاه از محلول سدیم کلراید یا محلول‌های هالوژن‌دار استفاده نکنید که باعث خوردگی دیواره دستگاه می‌شود.
- ز محلول‌های قلیائی یا اسیدی قوی استفاده نکنید .
- سنسور CO_2 :ر انکورباتورهای کشت سلولی تحت تأثیر میزان رطوبت بوده و پائین آمدن رطوبت باعث بالا رفتن میزان گازCO_2 در دستگاه می‌شود. تمیز نمودن مرتب این سنسور با الکل ۷۰ درصد یا ایزوپروپیل الکل ضروری است.
- هنگام استفاده از الکل جهت تمیز نمودن داخل انکوباتور دقت لازم را بعمل بیاورید بویژه اگر انکوباتور با الکل در درجه حرارت‌های بالا تمیز شود در این شرایط الکل بخار شده تمام فضای داخل باتور را فراگرفته و ممکن است خطر انفجار روی دهد بنابراین تمام الکل باقی مانده را به خوبی پاک کنید.
- برای جلوگیری از آلودگی در انکوباتورها ، قفسه‌ها و دیواره دستگاه همواره باید خشک باشد. در ثر بازماندن درب دستگاه به مدت طولانی رطوبت موجود درانکوباتور بصورت قطرات آب درآمده و این قطرات روی قفسه و دیواره‌ها باعث رشد باکتریها قارچها و مخمرها می‌شود در این موارد آب موجود را کاملاً خشک کنید و محل را به خوبی ضد عفونی نمایید بخصوص اگر مقداری از محیط کشت روی قفسه یا داخل انکوباتور ریخته است. به همین خاطر بیش از اندازه فلاسک‌های کشت را با محیط پرنکنید زیرا در اثر تکان خوردن این محیطها داخل انکوباتور ریخته و محل مناسبی را جهت رشد عوامل آلوده کننده بوجود می‌آورد.
- در صورت دیدن آلودگی در فلاسک‌های کشت بلافاصله تمام کشت‌ها را خارج نموده و داخل انکوباتور را بخوبی با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی نمائید قفسه‌ها را نیز می‌توانید در داخل فور قرار داده تا استریل گردند.
- تعویض به موقع ظرف آب داخل دستگاه ، در انکوباتورهای کشت سلولی بسیار ضروری است.
- بهترین انواع انکوباتورهای CO_2 آنهایی هستند که محفظه داخلی انکوباتور به قسمت‌های کوچکتری با دربهای جداگانه تقسیم شده‌اند که درصورت آلودگی در یک قسمت, از انتشار آن به سایر قسمت‌های دیگر جلوگیری شود. همچنین این نوع دستگاهها دارای سیستم خودکار

ستریلیزاسیون بوده که در هنگام ضدعفونی و تمیز کردن دستگاه می‌توان از آن استفاده نمود. همچنین دارای دو ورودی گاز CO_2 از دو سیلندر بوده تا در هنگام تمام شدن یک سر سیلندر از دیگری استفاده کند.

نکات ضروری درهنگام کاربا هود

هود ها را می توان به سه قسمت تقسیم کرد:

۱- میکروبی

۲- کشت سلولی

۳-شیمیایی

هودهای میکروبی و کشت سلول

مطمئن شوید که محیط داخل هود از کار قبلی تمیز شده است. برای اطمینان بیشتر یکبار دیگر به طور کامل داخل هود را با الکل ۷۰ درصد با دستمال بدون کرک پاک کنید.

به مدت حداقل ۱۵ دقیقه چراغ UV داخل هود را روشن نمائید (مرطوب بودن سطح داخل هود با الکل اثر اشعه را بیشتر می‌نماید. این نکته بسیار دارای اهمیت است که اثر UV محیط باید کاملاً تاریک باشد).

بعد از خاموش کردن چراغ UV هود را روشن نموده و ۱۵ دقیقه صبر نماید.

اعتماد به عمل فیلتراسیون هوا در جهت مؤثر هودها کمی قابل تأمل است و همیشه درصدی خطا وجود خواهد داشت. بنابراین هودها هرگز نمی‌توانند به طور کامل و ۱۰۰% مؤثر بوده ولی می‌توانند احتمال آلودگی را به میزان بسیار زیادی کاهش دهند، در نتیجه وجود هوای تمیز با تهویه مناسب در اتاق یا آزمایشگاهی که این هودها کار گذاشته شده‌اند و سایر تمهیداتی نظیر استفاده صحیح ، کنترل و تعویض بموقع فیلترها و جلوگیری از انتشار و پخش گرد و غبار در آزمایشگاه از عواملی است که می‌تواند ضریب اطمینان عملکرد این هودها را بالا برد.

جهت رسیدن به حداکثر راندمان کاری و اطمینان مستمر از عملکرد یک هود، کنترل مرتب آن بسته به شرایط استفاده تعداد استفاده کننده‌ها لازم و ضروری است.

هودهای مذکور باید درمحلی ایزوله و جدا از سایر قسمت‌های آزمایشگاه و جریانات شدید هوائی گاز گذاشته شوند (دور از دربها, پنجره‌ها, هواکش‌ها، خنک‌کننده‌ها و همچنین بدور از رفت و آمدهای زیاد کارکنان)

برنامه‌های مدون تمیز نمودن و ضدعفونی کردن هود از مواد بسیار ضروری است.

جهت جلوگیری از هرگونه رفت و آمدهای اضافی در هنگام کار، وسایل و مواد مورد احتیاج را قبلاً در اتاق کشت و در کنار هود آماده نمائید.

۹- ز جمع نمودن وسایل در زیر هود برای جلوگیری از ایجاد اختلال در جریانات هوائی خودداری کنید.

۱۰- تمام وسایلی که لازم است به داخل هود برده شوند باید با الکل ضدعفونی شوند و بخوبی با یک دستمال تمام سطوح وسایل و ظروف با الکل تمیز گردند.

۱۱- هرگز از وسایلی که مربوط به اتاق کشت نمی‌باشد استفاده نکنید همچنین وسایل اختصاصی مربوط به اتاق کشت را نیز برای کارهای دیگر به کار نبرید.

۱۲- ز کار کردن همزمان با نفر دیگر در مواقع غیر لازم خودداری کنید . تعداد عاملین بیشتر نیاز به وسایل بیشتر بوده و باعث ایجاد اختلال در جریان هوائی می‌شود.

۱۳- ناحیه مجاز در زیر هودهای ۱۰ سانتی متر پس از منفذها مکش هوا در جلوی هود است .

۱٤- از انجام حرکات سریع و ناگهانی دستها در داخل هود خودداری کنید.

۱۵- پوشیدن دستکش‌های لاتکس در هنگام کار ضروری است زیرا می‌توانید به راحتی این دستکش‌ها را به علت نداشتن خلل و فرج با الکل ضدعفونی کنید و متعاقباً الکل بری دستها نیز ضرری بدنبال نخواهد داشت.

۱٦- در صورت ریخته شدن مواد و محیطهای کشت حتماً ناحیه مزبور را بلافصله با دستمال آغشته به الکل خوب تمیز و پاک کنید.

۱۷- پس از اتمام کار تمام فضای داخل و سطوح را با الکل ۷۰ درصد تمیز کنید.

۱۸- در مواقعی که از هود استفاده نمی‌کنید حتماً درب پائین را ببندید . بسته بودن درب اتاق کشت نیز بسیار مهم است.

۱۹- جدا نمودن هودها برای فعالیتهای مختلف بسیار ضروری است.

۲۰- در مواردی که با مواد سیتوتوکسیک کار می‌کنید استفاده از عمل تدخین یا دودزدائی (Fumigation) با یکی از مواد ضدعفونی کننده مانند فرمالین مناسب است.

۲۱- روپوش آزمایشگاهی باید از جنسی باشد که از خود فیبرهای کمتری را آزاد کند تا وارد هود نشود.

۲۲- به دلیل استفاده از انواع رده‌های سلولی درکشت سلول که ممکن است میزبان طبیعی یا آلوده به میکروارگانیسم‌های خطرساز باشند حتماً وسایل مصرفی و زباله‌های باقی مانده محیط یا Reagent را بطور جداگانه اتوکلاو نماید و از انباشته شدن آنها در اتاق کشت خودداری کنید.

هودهای شیمیایی

در ابتدا برنامه کاری خود را تنظیم نموده و تمام وسایلی که مورد نیاز است در هود قبل از شروع کار قرار دهید

.

خوب کار کردن هود بستگی به سرعت جریان هوا در دخل هود دارد و فاکتورهای مختلفی در سرعت هوای قسمت جلوی هود و داخل آن مؤثر است .

مطمئن باشید که هود در جای مناسب و به دور از جریانات هوا قرار گرفته است.

درب جلوی هود را همیشه در پائین‌ترین سطح خود نگه دارید که در این صورت بهترین محافظت در برابر خارج شدن هوای داخل هود به بیرون است.

تمامی وسایل غیر لازم و شیشه‌های حاوی مواد شیمیایی را از درون هود خارج نموده و در قفسه‌های تعبیه شده در قسمت پائین هود قرار دهید نگهداری و ذخیره سازی شیشه‌ها در زیر هود باعث تجمع بخارات سمی و اختلال در جریانات طبیعی هود ایجاد می‌شود. البته ممکن است هودها را فقط برای ذخیره مواد در نظر بگیرند که بطور مداوم تولید بخارات سمی می‌نمایند.

به خاطر داشته باشید که در هر زمان از انجام حرکات سریع در زیر هود خودداری نمایید زیرا حرکات ناگهانی و سریع دستها یا جابجا نمودن وسایل باعث اختلال در جریان هوای داخل هود می‌گردد.

وسایل مورد نیاز به گونه‌ای درون هود قرار دهید که محلهای جریان هوای را مسدود نکرده باشند و همچنین از قسمت انتهای هود که محل خروج هوا بوده به دور باشند .

حداکثر ۸ سانتیمتر از داخل لبه خارجی هود به بعد کار نماید و در هنگام استفاده از مواد شیمیایی و یا وزن کردن آنها دستها در حد امکان در آخرین وضعیت در داخل هود قرار دهید.

در مواقعی که اطمینان کامل به کارایی مناسب هود ندارید می‌توانید با یک تکه یخ خشک هود را مورد امتحان قرار دهید در این حالت درب جلوی هود را در پایین‌ترین وضعیت خود قرار دهید . هنگامی بخارات متساعد شده از یخ خشک کمتر در محوطه داخلی هود پخش و بیشتر به طرف مجاری خروج هوا حرکت کنند می‌توانید از کارایی هود مطمئن باشید.

نکات ایمنی در رابطه با نیتروژن مایع(N_2)

دانستن نکات مهم زیر در رابطه با نیتروژن مایع بسیار ضروری :

۱- نیتروژن مایع بی رنگ و بو و بی‌نهایت سرد است و نقطه جوش آن $-۱۹۶^{\circ}C$ است که می‌توانند در صورت تماس مستقیم با پوست یا هر نقطه دیگر از بدن انسان نوعی سوختگی شدیدی ایجاد نماید. پس به هیچ عنوان جهت در آوردن ظرفنیتروژن مایع از دست خود استفاده نکنید.

۲- برای حمل و نقل نیتروژن مایع از ظروف مخصوص حمل نیتروژن مایع استفاده نمایید این ظروف را باید به آهستگی و حداکثر ۲/۳ حجم ظرف را از نیتروژن مایع پر نموده تا از وارد شدن شوک شدید سرما به ظرف که ممکن است باعث صدماتی شود جلوگیری گردد.

۳- برای جلوگیری از بخار شدن نیتروژن مایع لطفاً درب ظرف مورد نظر را بگذارید.

۴- از تماس پوست بدن با وسایلی که با نیتروژن مایع در تماس بوده اند اکیداً خودداری کنید.

۵- ستفاده از دستکش و عینک محافظ در موقع کار با نیتروژن مایع الزامی است.

۶- هرگز درب ظروفی که نیتروژن مایع را در آن حمل می‌نمایید یا نگهداری می‌کنید کاملاً محکم نبندید. زیرا به علت گاز نیتروژنی که تولید می‌شود فشار درونی بسیار بالا رفته علاوه بر ایجاد صدمه به ظرف امکان زیادی وجود دارد که انفجار صورت پذیرد هرگز ظروف را از نیتروژن پر ننمایید.

۷- نیتروژن مایع بی‌رنگ، بی‌بو، بی‌مزه و کشنده است. نیتروژن مایع به سرعت میزان اکسیژن محیط و بافت و هر قسمتی که روی آن ریخته شود را کاهش داده و باعث ایجاد اختناق(suffocation) می‌گردد. بنابراین هرگز نباید برای کنترل آن داخل ظرف را دید ، مزه یا بو نمود زیرا به سرعت استنشاق می‌گردد. به همین خاطر نیتروژن مایع باید در مکانهایی نگهداری شود که دارای تهویه می‌باشند. هنگامی که نیتروژن مایع بخار می‌شود باعث کاهش شدید غلظت اکسیژن هوا شده و ممکن است باعث سرگیجه ، بیهوشی و حتی مرگ گردد.

۸- از گذاشتن ظروف دربسته شیشه ای در داخل ظرف نیتروژن مایع جداً خودداری نمایید.

۹- ظروف پلاستیکی مانند اپندورف را می توان با استفاده از گیره های آهنی یا چوبی از داخل ظرف نیتروژن مایع خارج کرد.

۱۰- پس از استفاده ، باقیمانده نیتروژن مایع را فقط بر محیطهای سرباز و فقط روی زمین خالی نمایید و آنرا به ظرف اصلی اش بر نگردانید.

۱۱- ظروف نگهداری نیتروژن مایع در جای تمیز و خشک به دور از رطوبت، مواد تمیزکننده و مواد شیمیای یا سایر خورنده‌های شیمیایی نگهداری کنید این ظروف را فقط با آب یا محلولهای دتر جنت ضعیف بشویید و سپس خشك نماید .

۱۲- میزان بخار شدن نیتروژن مایع بسته به زمان موقعیت و شکل ظروف نگهداری و نحوهٔ استفاده از آن متفاوت است باز و بسته نمودن مستمر یا حرکت دادن ظرف حاوی نیتروژن از میزان اثر سرمازایی نیتروژن می‌کاهد. سطح نیتروژن مایع را در ظرف هر هفته باید اندازه‌گیری شود و مطمئن باشید که به اندازه کافی بوده تا به مواد نگهداری شده در آن صدمه وارد نشود .

۱۳- درمواقعی که شخصی به وسیله نیتروژن مایع دچار سرگیجه شد یا کمی بیهوش گردید اورا به محیطی که کاملاً باز باشد ببرید و از یک پزشک کمک بگیرد اگر تنفس برای او مشکل است از اکسیژن استفاده نماید و در صورت قطع تنفس آن، از تنفس مصنوعی استفاده کنید ، او را گرم نگهدارید تا پزشک از راه برسد.

۱۴- اگر نیتروژن مایع روی دست ، پا و یا صورت بریزد باید محل آسیب‌دیده را با دمای طبیعی بدن به سرعت هر چه بیشتر گرم نگه داشت، پوشش ناحیه را باید از پوست جدا کرد و ناحیه را در حمام آب ۴۲ تا۴۵ درجه سانتي گراد غوطه‌ور کرد.

۱۵- نیتروژن مایع مقادیر زیادی گاز تولید می‌نماید. یک لیتر نیتروژن مایع تقریباً ۰/۷ متر مکعب مربع گاز نیتروژن تولید می‌کند بنابراین در هنگامی که نیتروژن مایع را در ظروف درب بسته ریخته‌اید هنگام باز نمودن آن احتیاط نماید.

موارد ایمنی و کار با دستگاه مولد نور ماوراءبنفش (UV)

ازلامپ نور ماوراء بنفش(UltraViolet) برای مشاهده باندهای DNA جداشده روی ژلهای آگارز(Agarose) نیمار شده با محلول اتیدیوم بروماید (Ethidium Bromide) در دستگاه ژل داکیومیشن

(Gel documentation) استفاده می‌شود اثرات UV (باطول موج۲۵۴ نانومتر) بر پوست شامل ایجاد سوختگي ، لکه‌های پوستی و همچنین سرطان پوست می شود و در چشم ورم ، آب‌مروارید و سوختگی شبکیه ایجاد می‌نماید هنگام کار با دستگاههای مختلف مولد نور UV موارد ایمنی زیر را باید رعایت کرد:

پوشاندن تمامی قسمتهای پوست با استفاده از روپوشهای بلند و دستکشهای محافظ، مخصوصاً زمانی که از UV دستی استفاده می شود .

حتماً از عینک محافظ یا ماسك استفاده شود.

ابتدا ژل را بر روی صفحه دستگاه قرار دهید و پس از گذ اشتن شیشه محافظ لامپ UV را روشن نمایید در هنگامی که دستگاده روشن است از جابجاکردن ژل خودداری نماید در این وضعیت ابتدا دستگاه را خاموش نمایید و بعد ژل را جابجا کنید.

شیشه و اشیاء کدر نور UV را جذب می‌نمایند دقت نمایید حتماً بین پوست و چشم شما حتماً مانع شیشه‌ای یا کدر قرار داشته باشد تا از اثر مستقیم نور UV برأنها جلوگیری شود.

هنگام کار بادستگاه ژل داکیومنتشن مواظب باشید که از زوایای کناری شیشه محافظ در معرض نور UV قرار نگیرید . اغلب در هنگام کار با دستگاه اگر به طرفین دستگاه حرکت نمایید به علت فاصله شیشه از دستگاه در معرض نور UV قرار می‌گیرید.

پس از استفاده از دستگاه و پس از خاموش کردن آن ، جایی که ژل قرار داشته است را با آب مقطر و دستمال کاغذی تمیز نمایید.

حفاظت در برابر اشعه

عبارت است از حفاظت نسلهای آینده انسان و محیط زیست در برابر اثرات بیولوژیکی پرتوها به نحوی که هنوز بتوان از مواد پرتوزا یا رادیواکتیو و دستگاههای پرتو ساز در خدمت به زیستن و رفاه انسان استفاده نمود .

خطرات بالقوه کار با منابع پرتوزا

خطر پرتوگیری داخلی بدن: پرتوگیری تمام یا بخشی از بدن از چشمه‌های واقع در داخل بدن.

خطر پرتوگیری خارجی بدن: هر گونه پرتوگیری از دستگاههای پرتو ساز و یا منابع پرتوزا که خارج از بدن قرر دارند.

راههای حفاظت در برابر آلودگی داخلی بدن

پوشاندن یا محدود نمودن منبع

با توجه به اینکه ذرات a دارای برد بسیار کوتاهی در هوا می‌باشند هوا به عنوان یک ماده جاذب بکار برده می‌شود .

مواد جاذبی که دارای عدد اتمی کوچک هستند مانند آب و پلاستیک حفاظ مناسب برای چشمه‌های B زا می‌باشند .

مواد جاذبی که دارای عدد اتمی بالا هستند مانند سرب حفاظ مناسب پرتوهای X و گاما می‌باشند .

۲- نجهیز فرد به پوششهای حفاظتی و ابزار حفاظت دستگاه تنفس

پرتوگیری خارجی را می توان توسط عوامل زیر تا حد مطلوب ومورد نظر کاهش داد.

زمان پرتو گیری: دز(Dose) :دریافتی رابطه مستقیم بازمان پرتو دهی دارد.

فاصله با منبع پرتو: تندی دز پرتو بامجذور فاصله تاچشمه نسبت عکس دارد.

نوع ومقدار ماده پرتوزا

به منظور تعیین پرتوگیری خارجی افراد، دزیمترهای فردی تهیه شده است، فیلم بج، دزیمتر فردی متداول در ایران است. ملاک بررسی برای تعیین پرتوگیری شدت سیاهی فیلم درون بج می باشد. نظر به اینکه سیاه شدن فیلم به عوامل مختلف بستگی دارد. جهت استفاده از این دزیمترباید نکات زیر را رعایت کرد:

درمواقع غیر کار در محلی دور از تابش پرتو نگهداری شود.

در معرض تابش مستقیم نور خورشید، در محل های گرم ومرطوب، در معرض گازهای شیمیائی قرار نگیرد.

هنگام مراجعه به مراکز رادیولژی، دندانپزشکی، رادیو تراپی، پزشکی هسته ای نباید همراه داشته باشد.

لفاف کاغذی فیلم پاره یا سوراخ نشود.

محل قرار گیری فیلم در بج تغییر نکند.

توسط فردی استفاده شود که شماره به نام آن ثبت شده است.

فقط در مؤسسه درخواست کننده استفاده شود.

توصیه های لازم جهت کار با مواد پرتوزا

۱- نقط افرادی که دارای فیلم بج می باشند اجازه کار با مواد پرتوزا وورود به اتاق رادیواکتیو را دارند.

۲- محل هائی را از بدن که زخم هستند با پوشش مخصوص پوشانیده تامواد رادیواکتیو از این طریق وارد سیستم عمومی بدن نشوند.

۳- آزمایشگاه رادیواکتیو دارای دو جایگاه می باشد(site I, site II) پس از تعیین محل کار، مشخصات خواسته شده در دفترچه اتاق رادیواکتیو را پرنمائید.

۴- قبل از شروع کار با استفاده از گایگر، محل کار از نظر آلودگی چک شود.

۵- ستفاده از سینی های مخصوص کار با مواد پرتوزا حاوی کیسه زباله وکاغذ جاذب الزامی است.

۶- ستفاده از دستکش جراحی وروپوش آزمایشگاه الزامی است.

۷-کار با مواد رادیواکتیوحاوی بخار، زیر هود صورت گیرد و استفاده از ماسک الزامی است.

۸- پسمانهای مایع، بسته به نوع پرتو(بتا یا گاما) ،در ظرف مخصوص پسمان مایع جمع‌آوری گردد.

۹- پسمان جامد(تیپ، دستمال کاغذی، دستکش یکبار مصرف)باید در ظرف مخصوص پسمانهای جامد جمع آوری شود(بسته به نوع پرتو).

۱۰- پس از پایان کار با استفاده از گایگر، محل کار از نظرآلودگی مجدداً چک شود.

۱۱- انتقال وسایل نظیر میکروپیپت، میکروفیوژ، بن ماری و.... از اتاق رادیواکتیو به آزمایشگاههای دیگر اکیداً ممنوع است.

رفع آلودگی

رفع آلودگی از داخل سینی مخصوص کار بامواد پرتوزا

۱- با استفاده ازدستمال کاغذی، محلول را ازداخل سینی جمع آوری کنید.

۲- کیسه زباله وکاغذ جاذب درون آن را به ظرف پسمان جامد منتقل نمائید.

۳- با استفاده از گایگر از عدم آلوده بودن سینی اطمینان حاصل فرمائید.

۴- در صورت عدم رفع کامل آلودگی، سینی را در درون اتاق پسمان قرار دهید.

رفع آلودگی از روی میز کار یا زمین

مقداری دستمال کاغذی روی محلول ریخته شده قرار دهید.

با استفاده از مار کر ضدآب، اطراف محل آلوده رامشخص نمائید.

با استفاده از آب ومقداری دستمال کاغذی محل آلوده راچندبار تمیز نمائید.

با استفاده از گایگراز عدم آلوده بودن محل اطمینان حاصل فرمائید.

- رفع آلودگی از روی بدن

۱- محل هائی را که زخم هستند باپوشش مخصوص بپوشانید تا مواد رادیواکتیو از این طریق وارد سیستم عمومی بدن نشوند.

۲- بعضی از مواد روغنی برروی بدن بمالید تا از ورود این مواد ازطریق فولیکول‌های مو وسوراخهای غدد ترشحی جلوگیری شود.

۳- محل آلوده را با آب و صابون بشوئید بطوری که قسمت های سالم یا مکانهای حساس تر پوست مثل چشم آلوده نشوند.

۴- برای رفع آلودگی شدیدتر که لایه های شاخی پوست را هم پاک کند از محلول پرمنگنات پتاسیم استفاده شود وپس از چند دقیقه آن رابشوئید.

پرتوهای ماوراء بنفش(۱۰۰-٤۰۰nm)

اثرات بیولوژیکی پرتوهای ماوراء بنفش برپوست بدن وچشم محدود می گردد، میزان نفوذ این پرتوها در پوست بدن(۰/۱-۱nm) است.

نحوه کار با لامپUV

۱- از آنجا که پرتو ماوراء بنفش بر روی پوست وچشم اثر می گذارد، پوشیدن روپوش واستفاده ازعینک محافظ ودستکش هنگام کار با لامپUV :دستی(یا Transilluminator) الزامی است.

۲ – ابتدا درب دستگاه (Transilluminator)را بسته ، سپس دستگاه را روشن کنید.

۳- در موقع بریدن قطعه ای ازژل، دستگاه راطوری قراردهیدکه درب آن بطرف شما باز شودوصورت خود راپشت شیشه قرار دهید به گونه ای که پرتو ماوراء بنفش به پوست شما نتابد و در صورت نیاز از عینک مخصوص استفاده شود.

۴- حتماً درهنگام جابجا کردن ژل،دستگاه خاموش باشد.

۵- پس از پایان کار،حتماً روی شیشهTransilluminator را با استفاده از دستمال کاغذی خشک کنید.

حفاظت در برابر پرتو های ماوراء بنفش

۱- نواع شیشه پرتوهای ماوراءبنفش با طول موج های کمتر از۳۰۰ nmرا به خوبی جذب می کنند.

۲- غلب اجسامی که دربرابر نور معمولی کدرهستند، پرتوهای ماوراء بنفش به خصوص UV-Aراجذب می کنند.

۳- درمواردی که شدت پرتوهای ماوراء بنفش زیاد می باشد استفاده ازعینک مخصوص ضروری است.

۴- ستفاده ازلباس های آستین بلند و کاملاً پوشیده برای کار با پرتوهای ماوراء بنفش توصیه شده است.

۵- بی احتیاطی در هنگام کار با لامپ UV باعث سوختگی پوست و آسیب دیدگی چشم می شود.

مواد شیمیایی

قبل کار با مواد شیمیایی باید اطلاعات لازم در مورد خواص فیزیکی و شیمیایی ماده مورد نظر را مطالعه کرد(برای مثال اطلاعات فیزیکی و شیمیایی مربوط به متانل از قبیل فرمول، دمای احتراق، نقطه ذوب، رنگ،PH ، حلالیت در آب، آسیب هایی که می تواند برساند، SR و غیره . (یکی از بهترین منابع برای کسب اطلاعات کاتالوگ مرک می باشد).

از نکات قابل توجه آنست که در چیدمان مواد شیمیایی در آزمایشگاه باید نهایت دقت بعمل بیاید مثلاً ترکیبات شیمیایی مایع وفرار درزیر هودهای شیمیایی باتهویه مناسب قرار گرفته ودر قفسه های عمومی از چیدن ترکیباتی که سریع وارد برهم کنش با سایر مواد می شوند، کاملاً اجتناب نمود.همچنین قفسه ها حتی المقدور واجد درب بوده وهوای آزمایشگاه نیز تهویه مناسب داشته باشد. همچنین پوسترهای نشان دهنده علائم هشدار دهنده مواد شیمیایی در مکانهای مناسب ودر معرض دید افراد نصب شوند. همچنین افراد باید جهت دفع مواد شیمیایی بسیار زیان آورآموزش دیده وتجهیزات وامکانات ضروری، در آزمایشگاهها برای این امور اختصاص یابد.

جدول برخی از مواد شیمیایی ناسازگار که باید از یکدیگر دور نگه داشته شوند.

Acetic Acid	Chromic acid,Nitric acid,Permanganates
Acetone	Conccntrated nitricacidandsulfuricacid Mixtures, Hydrogenperoxide
Alkali and Alkaline	Carbon dioxide, Carbontelrachloridc, Other Chlorinated hydrocarbons, earth Metales suchas codium, potassium, …
Sulfuric acid	Chlorates , per chlorates , permanganates

from prudemt practices in the laboratoly Handling and Disposal or chemicals ,National Academy press, 1995.

چند نکته ایمنی در کار با مواد شیمیایی(مقررات عمومی)

- هیچگاه درآزمایشگاه به تنهایی کار نکنید(مگر بااطلاع سرپرست).
- از خوردن و آشامیدن در آزمایشگاه جداً خودداری نمایید.
- هیچگاه کیف ووسایل شخصی خود رادرمحیط آزمایشگاه نگذارید.
- به مقررات وقواعد نگهداری مواد شیمیایی مختلف دقت کنید.
- قبل از توزین یا برداشتن یک ماده برچسب ایمنی آن رامطالعه کنید.
- هیچگاه ماده ای رامستقیماً با دست برندارید، ضمناً از وسایلی نظیر اسپاتول استفاده کنید.
- در شکستن وخرد کردن مواد جامد تمرین ودقت کافی بعمل آورید،ممکن است پاشیدن و پرتاب شدن ذرات جامد به صورت شما یا اطراف وخطر انفجار شما راتهدید کند.
- از مزه کردن وچشیدن هر نوع ماده خودداری کنید.
- از برداشتن مایعات با پی پت توسط دهان خودداری کنید.
- از هود ودستکش وگلاوباکس وماسک برای کار با مواد خورنده یا سمی استفاده کنید.
- هیچگاه یک حلال یا مایع اشتعال پذیر را روی شعله قرار ندهید.
- هیچگاه اسیدها، قلیاها، مایعات سمی ویا اشتعال پذیر را در دستشویی خالی نکنید.

توضیح علائم روی بسته مواد

E(Explosive)در جایی غیر از انبار مواد نگهداری شود(قابل انفجار)

O(Oxidizing- Fire Promoting)(اکسید کننده- قابل اشتعال)تماس با مواد قابل اشتعال به حداقل برسد.

T(Very toxic)(بسیار سمی)تماس بابدن به هرشکلی محدود شود(رعایت حداکثر موارد ایمنی).

T(Toxic)سمي.

Xn(Harmful)(مضر) نباید بادست تماس پیداکند.

F+(Exteremely flammable)(بشدت قابل اشتعال)دردمای زیر صفر نگهداری شود.

F(Highly flammable)نگهداری دردمای زیر $21^{\circ}C$

C(Corrosive)(خورنده)ز تماس باکلیه سطوح بدن جلوگیری شود.

Xi(lrritant) کم خطر ترین

مواد شیمیایی را ز لحاظ سمیت وزیان می توان به یکی از چهار دسته زیر تقسیم کرد:

مواد با زیان بسیار زیاد: شامل موادسرطان زا، جهش زایا مسموم کننده درتولید مثل وحساسیت زاهای تنفسی

مواد بازیان زیاد:موادبسیار سمی،مواد سوزاننده وحساسیت زاهای پوستی

مواد با زیان متوسط:مواد مضر،مواد محرک وسوزش آور

مواد با زیان کم:موادی که بعنوان مواد خطرناک شناخته نمی شوند.

به منظوردستیابی به ایمنی بیشتر در آزمایشگاه عوامل چندی را می توان مد نظر داشت از جمله:

الف- آموزش افراد و رعایت اصول ایمنی نسبت به نوع موادشیمیایی مورد تماس ومصرف و ویژگیهای آنها بصورت کلی وتدریجی

ب- تجهیز آزمایشگاه به وسایل ومواد ضروری مورد نیاز سوانح(مانند جعبه کمک های اولیه، چشم شو، دوش اضطراری، پتوی مخصوص سوانح سوختگی) وآموزش کاربرد صحیح آنها

ج- آموزش کمکهای اولیه

د- تهیه دستور العمل های مدون ایمنی

مواد شیمیایی موجود در آزمایشگاه به سه حالت جامد،گازومایع موجود می باشند.

هر کدام از حالات فوق آثارمختلفی برفیزیولوژی موجودزنده دارند.

الف- موادشیمیایی بحالت گازی، بخار ویاذرات معلقی ، که از راه تنفس وارد ریه ها می شوند وآثار فیزیولوژیک خودرابصورت زیر ظاهر می کنند.

مواد التهاب آور ومحرک (مثل آمونیاک واسید هیدروکلریک)

مواد خفگی آور(ساده مثل دی اکسیدکربن،شیمیایی مثل منواکسیدکربن،اسید سیانیدریک)

موادبیهوش کننده ومخدر(مثل اتانول ودی اتیل اتر)

سموم سیستمیک(متانول،فنل ها،بنزن،کربن دی سولفید)

ذرات معلق(ازبست وسیلیس)

ب- مواد شیمیایی مایع نیز به اشکال زیر آثار خودرابر فیزیولوژی موجود زنده بروز می دهند:

۱- حلالهای آلی نظیر استون،کلروفرم،سیکلوهگزان،دی اتیل اتر،دی متیل سولفوکسید اتیل الکل،هگزان،متانول،تولوئن،متیلن کلرایدو...که علاوه بر اشتعال پذیری آثار مسموم کنندگی دارندوبرخی نیز خاصیت سرطان زایی و ناباور کنندگی نشان می دهد.

۲- معرفهای معدنی محلول مانند اسید سولفوریک ، اسیدهیدروکلریدریک ،آمونیاک ،آب اکسیژنه و...این ترکیبات همگی سوزاننده وبرخی خورنده می باشند وهر کدام اثر فیزیولوژیکی متفاوتی دارد.

ج- مواد شیمیایی جامد نیز می توانند باعث مسمومیت یا آثار دیگر شوند.

نکات ایمنی در مورد بعضی از مواد شیمیایی مهم :

کلروفرم

کلروفرم ماده سرطانزاست وسمیت تنفسی کلروفرم زیاد وسمیت پوستی آن کم است.علائم مسمومیت باکلروفرم:تهوع،سرگیجه،خواب آلودگی،کاهش سطح هوشیاری میباشد.

احتیاطهای لازم وکمکهای اولیه

درصورت پاشیدن به چشم،چشم را با آب فراوان به مدت حداقل ۱۵ دقیقه شستشو دهید.

در صورت آغشته شدن پوست فوراً آن را با آب و صابون بشوئید.اگر لباس به کلروفرم آغشته باشد آنرا عوض کنید.

در صورت بروز علائم مسمومیت با کلروفرم که معمولاً به سبب تنفس آن پدید می آید فردرا فوراً به هوای آزاد رسانیده در صورت اشکال تنفسی کمکهای اولیه را اجرا نمایید.

در مواردی که مقداری کلروفرم بطور اتفاقی خورده شود باید فرد آسیب دیده را در صورتی که کاملاً هوشیار باشد وادار به استفراغ کرد.

موارد نشت ماده در محیط آزمایشگاه یاریختن اتفاقی ماده به مقدار زیاد

افراد باید محوطه اطراف را به سرعت ترک کنند و تهویه مناسب برقرار شود. فرادی که مسئول تمیز کردن ماده هستند حتماً باید ماسک تنفسی وپوشش مناسب داشته باشند.

گوانیدین تیوسیانات

این ماده در تماس با اسیدها، عوامل اکسید کننده وگرما، گاز بسیار سمی سیانیدهیدروژن راآزاد می نماید. گرد گوانیدین تیوسیانات به مخاط تنفسی وچشم آسیب می رساند.

برای وزن کردن وکار با گرد ماده، زیر هود با پوشیدن دستکش وماسک کار شود.

هرگز محلول گوانیدین تیوسیانات با محلولهای اسیدی مخلوط نشود.

جهت دور ریختن محلولهای واجدگوانیدین،باسود غلیظ مخلوط شوند.

ماده دیگری به نام گوانیدین هیدروکلراید نیز وجود دارد که کاربرد وخطراتی مشابه با ماده گوانیدین تیوسیانات دارد.

کمکهای اولیه

هنگام تماس اتفاقی با پوست یا چشم بامقدار فراوان آب حداقل به مدت۱۵ دقیقه شستشو شود.

در صورت استنشاق اتفاقی پودر یا گاز متصاعد شده از محلولهای حاوی تیوسیانات، فرد را فوراً به هوای آزاد برسانید.

در صورت بلع اتفاقی ماده، فردآسیب دیده را وادار به استفراغ کنید.

فرد آسیب دیده را فوراً به مرکز فوریتهای پزشکی رسانیده ومسئول آزمایشگاه را در جریان بگذارید.

اکریل آمید

این ماده بشدت نوروتوکسین است واز راه پوست وتنفس بسرعت جذب می‌شود. اکریل آمید بر تولید مثل اثر سوء دارد وممکن است بروز ناهنجاریهایی در جنین شود.همچنین امکان دارد.سرطانزا باشد.علایم مسمومیت با آکریل آمید عبارتند از:منگی و گیجی، سوزن سوزن شدن،ضعف،عدم تعادل در راه رفتن،اختلال تکلم ولرز.

کمکهای اولیه

برای محلول سازی وتوزین پودر آکریل آمید حتماً زیر هود شیمیایی با استفاده از دستکش وماسک کار شود.

در صورت تماس محلول یا پودر آکریل آمید با پوست محل تماس را با آب فراوان وصابون به مدت۱۵ دقیقه شستشودهید.مسئول ایمنی رادر جریان قراردهید.

هنگام کار با محلول آکریل آمید حتماً دستکش لاتکس بپوشید.

در صورت خورده شدن اتفاقی محلول آکریل آمید فرد آسیب دیده را در صورتی که هوشیار باشد وادار به استفراغ کنید ودراسرع وقت به مرکز فوریتهای پزشکی برسانید.

درصورت تنفس ذرات آکریل آمید فردآسیب دیده را به فضای آزاد برسانید وفرد را به مرکز فوریتهای پزشکی انتقال دهید.

هنگام ریختن ژل محل کار خود را روزنامه یا لایه جذب کننده(مانند دستمال کاغذی)بپوشانید.

گیره ها، شیشه ها وSpacer های ژل را بعد از استفاده کاملاً بشوئید.

ژل غیر قابل استفاده را بعد از بستن کامل، با استفاده از دستکش در کیسه ای جداگانه قرار داده و بعد دور بریزید(اکریل آمید بصورت ژل کاملاً بسته شده اثر سمی کمتری دارد).

بهتر است بجای پودر آکریل آمید محلولهای آماده خریداری ومصرف شوند.

مر کاپتواتانل

این ماده سمی بوده واز راه تنفس وپوست جذب می شود.علائم مسمومیت ناشی از مرکاپتواتانل عبارتند از:حالت گیجی، لرز،گرفتگی گلو،سردرد،تهوع واستفراغ

احتیاطهای لازم وکمکهای اولیه

درصورت آلودگی چشم یا پوست محل را۱۵ :دقیقه باآب فراوان شستشو دهید.

هنگام بروز مسمومیت از راه تنفس فرد را به هوای آزاد انتقال دهید وبه مسئول ایمنی اطلاع دهید.

زیر هود شیمیایی وبا استفاده از دستکش وعینک محافظ با۲- مرکاپتواتانل کار کنید.

اتیدیوم بروماید

این ماده موتاژن وسرطانزا است، چشم ودستگاه تنفسی می تواند نفوذ کند.

احتیاطهای لازم وکمکهای اولیه

- هنگام کار با اتیدیوم بروماید از دستکشهای پلاستیکی وعینکهای محافظ وماسک استفاده شود.

- توزین اتیدیوم بروماید حتماً باید در مکان بسته بدون جریان شدید هوا با استفاده از ماسک ودستکش دو لایه انجام شود.

- زباله های آلوده به اتیدیوم بروماید، با فرها وژلهای آلوده به طور مجزا دفع شود.

- دستکش و سایر لوازم آلوده به اتیدیوم بروماید را هرگز از اتاقUV خارج نکنید.

- در صورتی که لباس یا پوست به اتیدیوم بروماید آغشته شود باید فوراً لباس آلوده را از تن خارج کردوپوست را با مقدار فراوان آب وصابون شستشو داد.

- در صورت آلوده شدن چشم باید آن رابا آب فراوان به مدت حداقل۱۵ دقیقه شستشو داد.

- در صورت بروز هر حادثه ای در حین کار با اتیدیوم بروماید مسئول ایمنی یا مسئول آزمایشگاه را در جریان قراردهید.

فنل

فنل ماده‌ای سمی و فراراست که از راه پوست واستنشاق بخارات آن واردبدن می شود.فنل به شدت سوزاننده است.سوختگی های ناشی از فنل به سبب خاصیت بی حس کنندگی موضعی، علیرغم وسعت آسیب وعمق سوختگی ممکن است درد چندانی نداشته باشند فنل وبخارات آن آتش گیر است. علائم مسمومیت با فنل عبارتست از:

دردشکم، سرگیجه، سردرد، تهوع واستفراغ، تپش قلب وسرانجام کما ومرگ. در صورتی که فنل روی پوست بریزد،سوختگی های شدیدبدون درد ایجاد می کند.مناطقی که فنل به آنها رسیده باشد،رنگ پریده می شوند.سوختگي۲۵% ز سطح بدن با فنل می تواند کشنده باشد.

کمکهای اولیه

فردی را که با بخار فنل مسموم شده باشد فوراً باید از محل دور کرد وبه فضای آزاد رسانید تا به راحتی تنفس کند در صورت نیاز تنفس مصنوعی انجام بگیرد.

در صورت ریختن اتفاقی فنل لباس آلوده به فنل باید فوراً از تن خارج شده ومحل تماس با مقدار زیاد آب شستشو داده شود. شستشو باید آنقدرادامه یابد تا رنگ پوست محل آسیب دیده از حالت رنگ پریده به صورتی کم رنگ تغییر رنگ دهد.

در صورت پاشیدن اتفاقی فنل به چشم باید چشم فرد آسیب دیده با جریان مداوم آب حداقل به مدت۲۰ دقیقه شستشو شود وفردآسیب دیده پس از شستشوی چشم باید به چشم پزشک مراجعه نماید.

نکته مهم اینکه در صورت بروز هر کدام از موارد فوق پس از اقدام اولیه فردآسیب دیده باید به مرکز فوریتهای پزشکی منتقل شود.

نکات عملی کار با فنل در آزمایشگاه

بدلیل انتشار بخارات سمی فنل در هوا،عمل اشباع وموازنه کردن این ماده ونیز استفاده ازآن برای استخراجDNA یا RNAحتماً باید زیر هود شیمیایی با تهویه مناسب انجام بگیرد.

هنگام کار با این ماده حتی الامکان از روپوش آزمایشگاه ودستکش محافظ(حداقل لاتکس) و در صورت امکان ازعینک محافظ،پیش بند و کفش های پوشیده استفاده شود.

هنگام کار با فنل باید از هر نوع منبع اشتعال دور باشیم.

در صورت آلودگی محیط کار(سطح میز یا زمین)با محلول فنل باید:

۱- هرنوع منبع اشتغال رااز محیط دور کرد.

۲- فضای آلوده را هر چه سریعتر تهویه نمود.

۳- جهت خنثی کردن فنل ازآهک خشک ویاجوش شیرین(محلولهای قلیایی ضعیف)استفاده نمود.

۴- چون فنل بسیار درآب محلول است، می‌توان سطح آلوده رابا مقدار فراوان آب شستشو داد.

ذخیره سازی مواد

در حین انجام آزمایشها همیشه با موادی کار می‌کنیم که یکی از این موارد هستند موادی که خریداری می‌شوند، موادی تقسیم بندی می‌شوند یا دوباره بسته بندی می‌شوند محلولهایی که ساخته می‌شود، نمونه‌هایی که جمع‌آوری می‌شوند ، موادی مانند سویه‌ها کلونها و ... که بدست می‌آیند . همهٔ این گونه موارد ممکن است روزی مورد استفاده سایرین قرار گیرد و یا سایرین در معرض آنها قرار گیرند. بنابراین لازم است به دو شکل اطلاعات مربوط به مواد ذخیره شده حفظ گردند:

الف _ در روی بطری و یا بسته بندی بایستی حداقل اطلاعات زیر درج شوند:

نام ماده

غلظت

نام سازنده (نام شرکت یا تهیه کننده)

تاریخ تهیه

تاریخ انقضاء یا مدت پایداری

نوع خطر

شرایط نمونه در زمان دریافت و منبع آن

ب _ فهرست موارد موجود: معمولاً پس از طبقه‌بندی مواد، اطلاعات زیر معمولاً در جداولی که به راحتی قابل مراجعه وبازیابی باشند درج می گردد.

نام ماده

غلظت

نام سازنده

تاریخ تهیه

تاریخ انقضاء ویا مدت پایداری

نوع خطر

محل ذخیره

یادداشت برداری وتهیهٔ گزارش(Documentations)

علاوه برنحوه انجام پژوهش ورعایت نکات ایمنی، نحوه یادداشت برداری در موارد زیر نیز جزو شرایطGLP مي باشد:

تهیه طرح پژوهشی

انجام آزمایش ویادداشت برداری از داده های خام

تجزیه وتحلیل داده ها وگزارش پیشرفت کار

ذخیره سازی مواد

ارائه مقاله

لازم به ذکر است به دلایل متعدد نگارش یادداشت هاوگزارش ها به زبان انگلیسی همواره توصیه می شود.

تهیه طرح پژوهشی

اگرچه معمولاً تهیه طرح پژوهشی در پرسشنامه های سازمان بررسی کننده است. در اکثر موارد زیر در یک طرح پژوهشی می آیند بطوریکه پژوهشگر ضمن آنکه مراحل بعدی کار خود راطراحی می کند، به دیگران نیز امکان بررسی وداوری آنرا بدهد .

الف- بیان مسئله واهمیت آن(significance)

ب- گرایش برای حل مسئله(Approach) _ شامل زاویه برخورد برای حل مسئله،آزمایش ها و مراحل اجرایی طرح

ج- قابلیت انجام(Feasibilily): امکانات موجود و مورد نیاز و نحوهٔ تهیه آنها نیروی انسانی و وظایف هر یک، زمان بندی، بودجه و....

انجام آزمایش و یادداشت برداری از داده‌های خام(Raw data)

قبل از شروع هر آزمایش، با توجه به طرح پژوهشی واطلاعات بدست آمده ازآزمایشهای قبلی،جزئیات عملیات بعدی یادداشت می گردد که حداقل شامل موارد زیر است:

الف- تاریخ انجام آزمایش(این تاریخ می تواند به عنوان شمارهٔ مرجع نیز استفاده شود).

ب- موضوع موردآزمایش

ج- مواد ولوازم مورد استفاده

د- پروتکل مورد استفاده

ه- نام و شمارهٔ نمونه‌ها

و- جزئیات مربوط به واکنش(نام متد، غلظتها ومقادیر مورد استفاده)

ز- برنامهٔاجراشده:مدت زمان آزمایش وشرایط آن

ح- یادداشت برداری از داده‌های بدست آمده مانند درج عکس و نوشتن اطلاعات مربوط زیر یا کنار آن

تذکرات

- Raw data بایستی طوری باشد که بتوان آزمایش انجام شده را از ابتدا بازسازی کرد.

- جمع آوری داده ها بایستی بطور کامل و صحیح بلافاصله پس از انجام آزمایش یادداشت شوند.

- یادداشت ها بایستی گویای Who,What, when, why, whereباشند.

- داده های قبلی (حتي غيرصحيح)نبايستي حذف شوند.

- همواره محرمانه بودن اطلاعات مورد توجه قرار گیرد.

گزارش پیشرفت کار

این گزارش از یک نگاه محصول کار وسرمایه گذاری فرد ومرکز است. ما بایستی طوری تهیه شود که بخوبی کارهای انجام شده ونتایج بدست آمده را منعکس نماید و ضمناً قابل استفاده برای پژوهشگران بعدی باشد. انتظار می رود هر گزارش شامل بخش های زیر می باشد:

الف- عنوان طرح و بخش مورد آزمایش

ب- زمان و شمارهٔ ترتیب گزارش

ج- نام افرادی که در انجام آن بخش دخالت داشته اند و محدودهٔ کاری هر یک

د- مقدمه متشمل برمروری بر اطلاعات موجود و ماهیت و دلایل پژوهش انجام شده

ه- مواد وروشهای مورد استفاده- مانند مقالات

و- نتایج بدست آمده که بصورت اطلاعات تجزیه و تحلیل شده ارائه می شود. معمولاً درست نیست داده‌های خام آورده شوند مگر آنکه دارای اهمیتی خاص باشد. جداول و شکل بایستی بطور مستقل نیز گویا باشند.

ز- بحث و ارزیابی نتایج بدست آمده بویژه در ارتباط با اطلاعات قبلی و پژوهشهای دیگر و ارائه جمع بندی نهايي.

ح- نحوه ذخیره سازی نمونه ها ومحصولات احتمالی (با توجه به بخش۴)و بیان آدرس دقیق محل نگهداری آنها

ط- منابع

توجه: گزارش پیشرفت توسط مجری طرح امضاء میشود ومسئولیت صحت مفاد آن با وی است.

ذخیره سازی مواد

در حین انجام آزمایشها همیشه با موادی کار می‌کنیم که يكي از این موارد هستند موادی که خریداری می‌شوند، موادی تقسیم بندی می‌شوند یا دوباره بسته بندی می‌شوند محلولهايي که ساخته مي‌شود، نمونه‌هايي که جمع‌آوری می‌شوند ، موادی مانند سویه‌ها کلونها و ... که بدست مي‌آيند . همهٔ این گونه موارد ممکن است روزی مورد استفاده سایرین قرار گیرد و یا سایرین در معرض آنها قرار گیرند. بنابراین لازم است به دو شکل اطلاعات مربوط به مواد ذخیره شده حفظ گردند:

الف _ در روی بطری و یا بسته بندی بایستی حداقل اطلاعات زیر درج شوند:

نام ماده

غلظت

نام سازنده (نام شرکت یا تهیه کننده)

تاریخ تهیه

تاریخ انقضاء یا مدت پایداری

نوع خطر

شرایط نمونه در زمان دریافت و منبع آن

ب _ فهرست موارد موجود: معمولاً پس از طبقه‌بندی مواد، اطلاعات زیر معمولاً در جداولی که به راحتی قابل مراجعه وبازیابی باشند درج می گردد.

نام ماده

غلظت

نام سازنده

تاریخ تهیه

تاریخ انقضاء ویا مدت پایداری

نوع خطر

محل ذخیره

ارائه مقالات

چارچوب مقاله یا چکیده مقاله معمولاً توسط ناشر و یا برگزارکنندهٔ کنفرانس‌ها تعیین می شود.آنچه لازم است دراینجا اشاره شود این است که انتشار هرگونه اطلاعات مربوط به طرحهای پژوهشی مرکز تحت نظر مجری طرح صورت می گیرد ومسئولیت انتشار این اطلاعات بعهدهٔ وی است. این مسئولیت شامل درست یا نادرست بودن اطلاعات منتشر شده ودر نظر گرفتن منافع طرح و مرکز است.استعلام از امور پژوهشی مرکز در موارد تردید آمیز قویاً توصیه می شود.

بایگانی پژوهشی مرکز

بر طبق روال فعلی مرکز،تاپایان هر طرح کلیه اطلاعات در اختیار مجری طرح قرار دارد.لکن در هنگام تسویه حساب و در صورتی که طرح بعدی ادامهٔ طرح قبلی نباشد کلیه اطلاعات خام(دفاتر و....) تحویل امور پژوهشی می گردد. ین موضوع درمورد محصولات طرح اعم از کیت،سویه،کلون و....نیز صادق است.مور پژوهشی نیز سیستم نگهداری آنها را تهیه می بیند بطوریکه به عنوان اسناد محرمانه واموال مرکز محافظت شوند. تنها افراد مجاز می توانند به این اطلاعات ومواد دسترسی داشته باشند.

ضمیمه (Index):

داده های کلی(General Data) :

۱- کد های ژنتیکی (The Genetic Code) :

Second Position							
First Position (5´ end)		U	C	A	G		Third Position (3´ end)
	U	UUU Phe UUC UUA Leu UUG	UCU Ser UCC UCA UCG	UAU Tyr UAC UAA *Stop* UAG *Stop*	UGU Cys UGC UGA *Stop* UGG Trp	U C A G	
	C	CUU Leu CUC CUA CUG	CCU Pro CCC CCA CCG	CAU His CAC CAA Gln CAG	CGU Arg CGC CGA CGG	U C A G	
	A	AUU AUC Ile AUA AUG Met	ACU Thr ACC ACA ACG	AAU Asn AAC AAA Lys AAG	AGU Ser AGC AGA Arg AGG	U C A G	
	G	GUU Val GUC GUA GUG	GCU Ala GCC GCA GCG	GAU Asp GAC GAA Glu GAG	GGU Gly GGC GGA GGG	U C A G	

Termination Signals

UAA (Ochre)

UAG (Amber)

UGA (Opal)

Single Letter Code

A = adenosine

C = cytidine

G = guanosine

T = thymidine

B = C or G or T

D = A or G or T

H = A or C or T

K = G or T

M = A or C

N = A or C or G or T

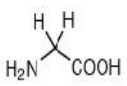
R = A or G

S = C or G
V = A or C or G
W = A or T
Y = C or T

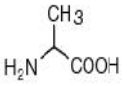
۲- ساختارهای اسید های آمینه (Amino Acid Structures) :

!Error

Small

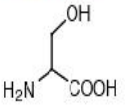


Glycine (Gly, G)
MW: 57.05

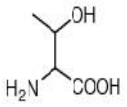


Alanine (Ala, A)
MW: 71.09

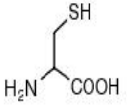
Nucleophilic



Serine (Ser, S)
MW: 87.08, pK_a ~ 16

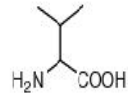


Threonine (Thr, T)
MW: 101.11, pK_a ~ 16

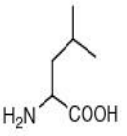


Cysteine (Cys, C)
MW: 103.15, pK_a = 8.35

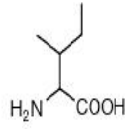
Hydrophobic



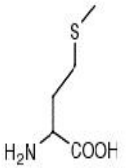
Valine (Val, V)
MW: 99.14



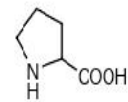
Leucine (Leu, L)
MW: 113.16



Isoleucine (Ile, I)
MW: 113.16

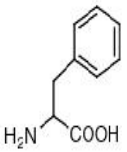


Methionine (Met, M)
MW: 131.19

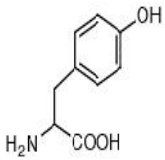


Proline (Pro, P)
MW: 97.12

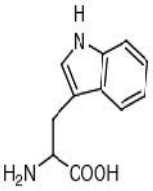
Aromatic



Phenylalanine (Phe, F)
MW: 147.18

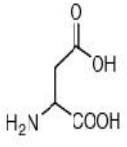


Tyrosine (Tyr, Y)
MW: 163.18

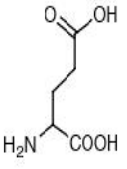


Tryptophan (Trp, W)
MW: 186.21

Acidic

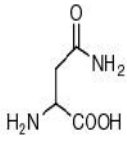


Aspartic Acid (Asp, D)
MW: 115.09, pK_a = 3.9

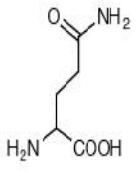


Glutamic Acid (Glu, E)
MW: 129.12, pK_a = 4.07

Amide

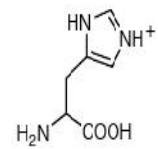


Asparagine (Asn, N)
MW: 114.11

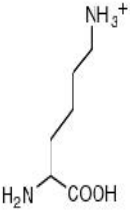


Glutamine (Gln, Q)
MW: 128.14

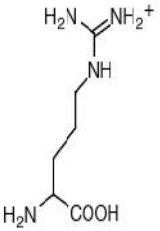
Basic



Histidine (His, H)
MW: 137.14, pK_a = 6.04



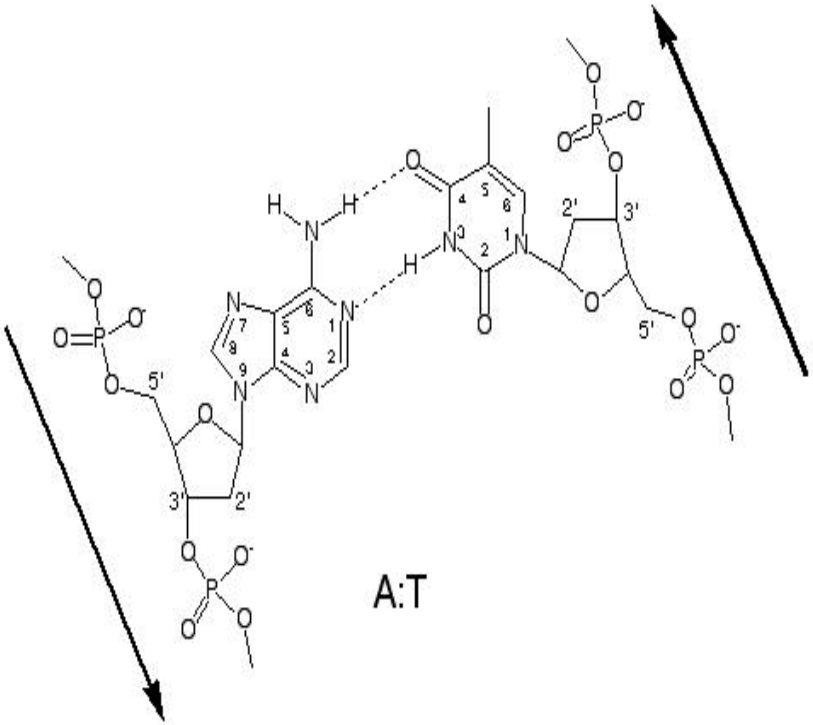
Lysine (Lys, K)
MW: 128.17, pK_a = 10.79



Arginine (Arg, R)
MW: 156.19, pK_a = 12.48

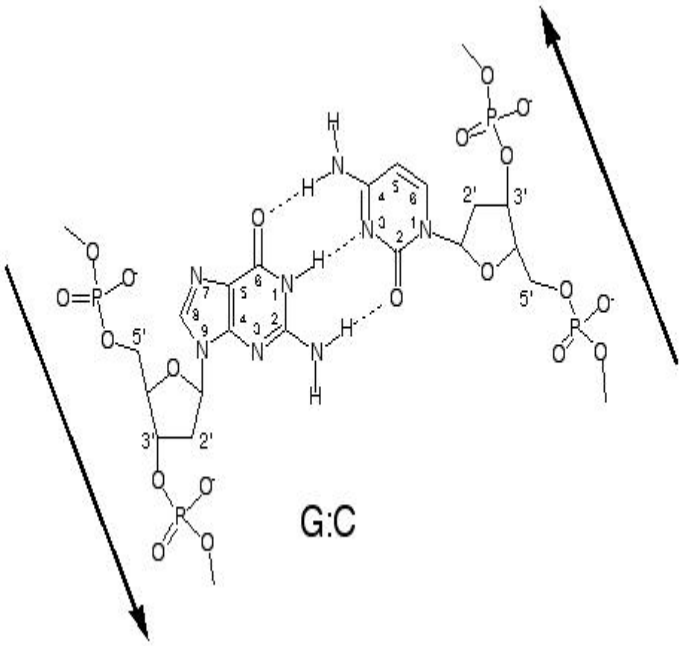
۳- جفت باز های DNA

ساختار پیوند آدنین و تیمین : این دو باز DNA به وسیله دو پیوند هیدروزنی به هم متصل می شوند. پیکانها جهت رشته DNA از سمت ۳′ به ۵′ را نشان می



دهد.

ساختار پیوند گوانین و سیتوزین: این دو باز DNA به وسیله سه پیوند هیدروزنی به هم متصل می شوند. پیکانها جهت رشته DNA از سمت ۳′ به ۵′ را نشان می دهد.



۴- داده های نوکلئیک اسید (Nucleic Acid Data) :

Average weight of a DNA basepair (sodium salt) = 650 daltons

1.0 A_{260} unit ds DNA = 50 µg/ml = 0.15 mM (in nucleotides)
1.0 A_{260} unit ss DNA = 33 µg/ml = 0.10 mM (in nucleotides)
1.0 A_{260} unit ss RNA = 40 µg/ml = 0.11 mM (in nucleotides)

MW of a double-stranded DNA molecule = (# of base pairs) X (650 daltons/base pair)
Moles of ends of a double-stranded DNA molecule = 2 X (grams of DNA) / (MW in daltons)
Moles of ends generated by restriction endonuclease cleavage:
a) circular DNA molecule: 2 X (moles of DNA) X (number of sites)
b) linear DNA molecule: 2 X (moles of DNA) X (number of sites) + 2 X (moles of DNA)

1 µg of 1000 bp DNA = 1.52 pmol = 9.1 X 10^{11} molecules
1 µg of pUC18/19 DNA (2686 bp) = 0.57 pmol = 3.4 X 10^{11} molecules
1 µg of pBR322 DNA (4361 bp) = 0.35 pmol = 2.1 X 10^{11} molecules
1 µg of M13mp18/19 DNA (7249 bp) = 0.21 pmol = 1.3 X 10^{11} molecules
1 µg of □ DNA (48502 bp) = 0.03 pmol = 1.8 X 10^{10} molecules

1 pmol of 1000 bp DNA = 0.66 µg
1 pmol of pUC18/19 DNA (2686 bp) = 1.77 µg
1 pmol of pBR322 DNA (4361 bp) = 2.88 µg
1 pmol of M13mp18/19 DNA (7249 bp) = 4.78 µg
1 pmol of □ DNA (48502 bp) = 32.01 µg

1.0 kb DNA = coding capacity for 333 amino acids □ 37,000 dalton protein
10,000 dalton protein □ 270 bp DNA

50,000 dalton protein □ 1.35 kb DNA

۵ - ایزو توپ ها :

Isotope	Particle Emitted	Half Life
^{14}C	□	5,730 years
^{3}H	□	12.3 years
^{125}I	□	60 days
^{32}P	□	14.3 days
^{33}P	□	25 days
^{35}S	□	87.4 days

۶- اسید ها وبازها :

Compound	Formula	Molecular Weight	Specific Gravity	% by Weight	Conc. Reagent Molarity
Acetic acid, glacial	CH_3COOH	60.0	1.05	99.5	17.4
Formic acid	HCOOH	46.0	1.20	90	23.4
Hydrochloric acid	HCl	36.5	1.18	36	11.6
Nitric acid	HNO_3	63.0	1.42	71	16.0
Perchloric acid	$HClO_4$	100.5	1.67	70	11.6
Phosphoric acid	H_3PO_4	98.0	1.70	85	18.1
Sulfuric acid	H_2SO_4	98.1	1.84	96	18.0
Ammonium hydroxide	NH_4OH	35.0	0.90	28	14.8
Potassium hydroxide	KOH	56.1	1.52	50	13.5
Sodium hydroxide	NaOH	40.0	1.53	50	19.1
ß-mercaptoethanol	$HSCH_2CH_2OH$	78.1	1.11	100	14.3

۶- پروتئین ها :

Bacterial Cells: E. coli or Salmonella typhimurium

Cell Data	per cell	per liter at 10^9 cells per ml
Wet Weight	9.5×10^{-13} g	0.95 g
Dry Weight	2.8×10^{-13} g	0.28 g
Total Protein	1.55×10^{-13} g	0.15 g

Volume	1.15 μm^3 = 1 femtoliter	
Protein Conc. in the cell: 135 mg/ml		
Theoretical maximum yield for a 1 liter culture (10^9 cells /ml) if protein of interest is: 0.1% of total protein: 150 µg/liter 2.0% of total protein: 3 mg/liter 50.0% of total protein: 75 mg/liter		

۸ – خصوصیات عمومي ژنی پلاسمید ها :

Gene	Gene Product # of Residues	Molecular Weight (daltons)
tet (pBR322)	401 bp	43,267
amp (pBR322)	286	31,515
kan (pACYC177)	264	29,047
cam (pACYC184)	219	25,663
lacZ'alpha (pUC19)	107	12,232
lacZ	1,023	116,351

۹- خصوصیات فیزیکی نوکلئوتید :

Compound	Molecular Weight	*Lambda* max (pH 7.0)	Absorbance at □ max 1 M solution (pH 7.0)
ATP	507.2	259	15,400
CTP	483.2	271	9,000

GTP	523.2	253	13,700
UTP	484.2	262	10,000
dATP	491.2	259	15,200
dCTP	467.2	271	9,300
dGTP	507.2	253	13,700
dTTP	482.2	267	9,600

۱۰- الکتروفورزها :

لف- تفکیک ژل آگازر :

Amount of Agarose in gel (% w/v)	Optimum Resolution for Linear DNA (kb)
0.5	30 to 1.0
0.7	12 to 0.8
1.0	10 to 0.5
1.2	7 to 0.4
1.5	3 to 0.2
2.0	2 to 0.1

ب- سرعت های حرکت مارکر از خلال ژل اکریل آمید :

% polyacrylamide	Bromophenol blue[a]	Xylene cyanol FF[a]
5	35	130
6	26	106
8	19	76
10	12	55

[a] The numbers are the approximate sizes of DNA (in nucleotides) with which the marker dye co-migrates

ج- دامنه موثر تفکیک DNA در ژل های پلی اکریل آمید :

% polyacrylamide		Bromophenol blue[a]	Xylene cyanol FF[a]
5		35	130
6		26	106
8		19	76
10		12	55
20		8	28

د- غلظت پیشنهادی اکریل آمید برای تفکیک پروتئین :

% Acrylamide in resolving Gel	Separation size range (Mr $\times 10^3$)
5	36-205
7.5	24-205
10	14-205
12.5	14-66*
15	14-45*

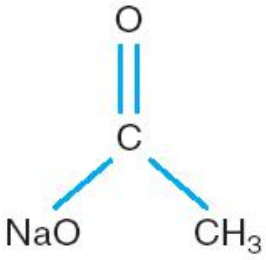
* The large proteins fail to move significantly into the gel

۱۱- pH و دمای بافر تریس :

pH of Tris Buffer (0.05 M)		
5°C	25°C	37°C
7.76	7.20	6.91
7.89	7.30	7.02
7.97	7.40	7.12
8.07	7.50	7.22
8.18	7.60	7.30
8.26	7.70	7.40
8.37	7.80	7.52
8.48	7.90	7.62
8.58	8.00	7.71
8.68	8.10	7.80
8.78	8.20	7.91
8.88	8.30	8.01
8.98	8.40	8.10
9.09	8.50	8.22
9.18	8.60	8.31
9.28	8.70	8.42

۱۲- سیستم بافری مورد استفاده برای نوکلئیک اسید ها ، پپتیدها و پروتئین ها :

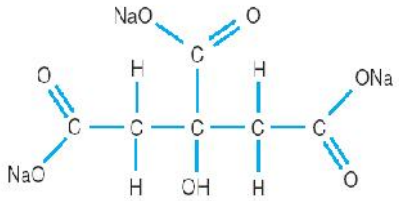
a) Sodium acetate buffer

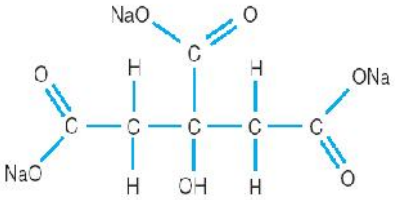


CH3COONa • 3H2O Mr 136.08 CAS No [6131-90-4] EC No 2048238
Titrated with Hydrochloric Acid covering the pH range 3.6 to 5.6.

b) Sodium citrate buffer

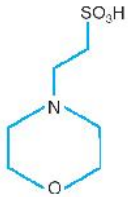
b) Sodium citrate buffer





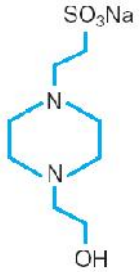
C6H5Na3O7 • 2H2O Mr 294.10 CAS No [6132-04-3] EC No 2006753
Titrated with Hydrochloric Acid covering the pH range 4.2 to 6.5.

c) 2-Morpholinoethanesulfonic acid monohydrate,



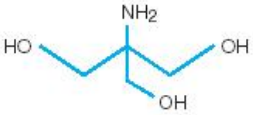
MES
C6H13NO4S • H2O Mr 213.25 CAS Number [4432-31-9] EC No 2246323
Titrated with Hydrochloric Acid covering the pH range 5.2 to 7.1.

d) 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid Sodium salt,

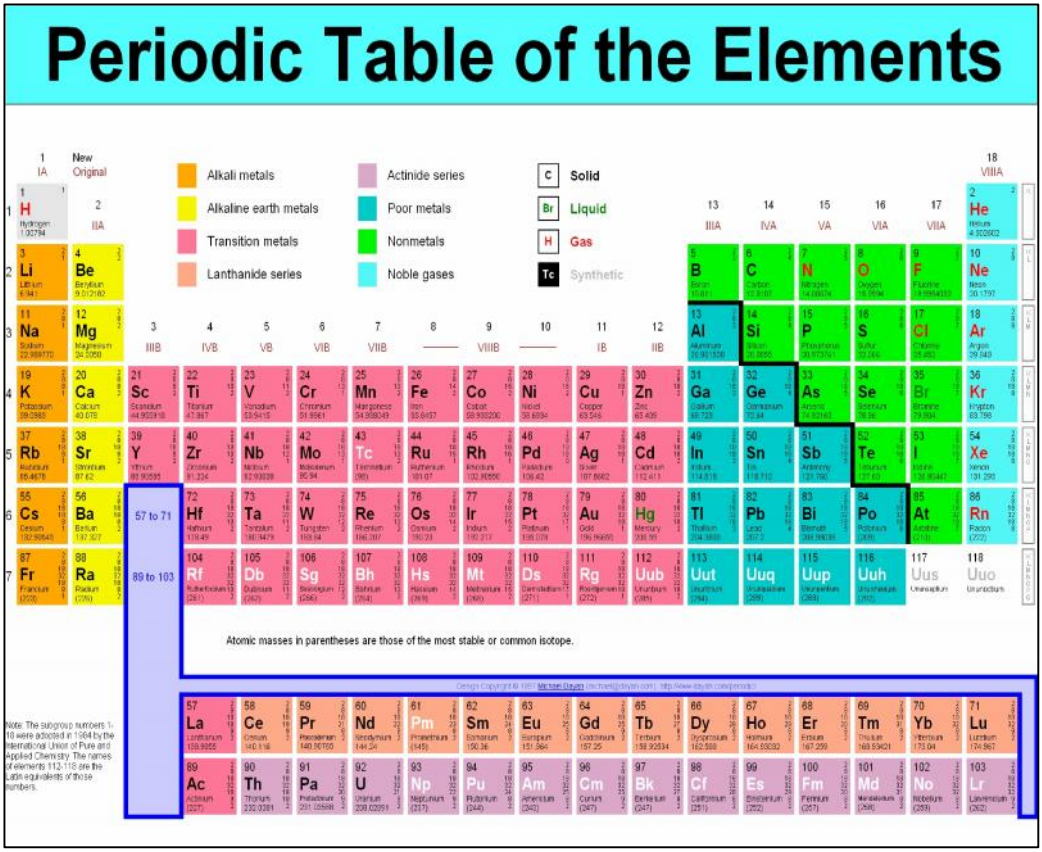


HEPES-Na
C8H17N2NaO4S Mr 260.30 CAS No [75277-39-3] EC No 2781697
Titrated with Hydrochloric Acid covering the pH range 6.8 to 8.2.

e) Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride,



Tris
C4H11NO3 • HCl Mr 157.60 CAS No [1185-53-1] EC No 2146845
Titrated with Sodium Hydroxide covering the pH range 7.0 to 9.0.


Periodic Table of the Elements
Alkali metals
Alkaline earth metals
Transition metals
Lanthanide series
Actinide series
Poor metals
Nonmetals
Noble gases
Solid
Liquid
Gas
Synthetic
Atomic masses in parentheses are those of the most stable or common isotope.

Acetone CH_3COCH_3	Colourless volatile liquid with sweetish odour; m.p. −95 °C, b.p. 56 °C; miscible with water.	Slight eye, nose and throat irritation. Inhalation may cause dizziness, narcosis and coma.	Highly flammable; flashpoint −18 °C explosive limits 2.2–12.8%.	Keep container in well-ventilated area, keep away from sources of ignition. Do not breathe vapour. Use respiratory protection; wear eye protection.	Reacts violently with oxidizers (e.g. chromic and nitric acids) and chloroform in the presence of base. Incompatible with concentrated sulfuric and nitric acid mixtures.	Earth/ground large containers and vessels to prevent static electricity.
Acetonitrile CH_3CN	Colourless liquid with an aromatic odour; m.p. −46 °C b.p. 82 °C.	Respiratory, eye and skin irritation. Exposure may result in convulsions unconsciousness, cyanide poisoning.	Highly flammable; flashpoint 12.8 °C explosive limits 3.0–16%.	No open flames, no sparks, no smoking, no contact with oxidants. Use only in areas free of ignition sources. Store in tightly sealed containers in areas separate from oxidizers. Work with exhaust ventilation. Avoid skin, eye and mucous membrane contact. Use respiratory protection and rubber gloves.	Reacts with aqueous acids and bases, producing toxic fumes. Reacts with strong oxidants. Attacks some forms of plastic, rubber and coatings. Decomposes on burning producing hydrogen cyanide and nitrogen oxides.	
Acetylene $HC{\equiv}CH$	Colourless gas with a faint, ethereal or garlic-like odour shipped under pressure, dissolved in acetone m.p. −81 °C sublimes at −84 °C.	Simple asphyxiant; frostbite on skin contact.	Extremely flammable; flammable range 2.5–100%.	For skin protection use cold-insulating gloves and safety goggles or face shield. No open flames, no sparks, no smoking. Work with local exhaust ventilation, explosion-proof electrical equipment and lighting.	Strong reducing agent, reacts violently with oxidants and with fluorine or chlorine under influence of light. Reacts with copper, silver and mercury or their salts, forming shock-sensitive compounds.	
Acetic anhydride $(CH_3CO)_2O$	Colourless liquid with a strong pungent, vinegar-like odour; m.p. −73 °C b.p. 139 °C.	Severe irritation of eyes and upper respiratory tract irritation; corrosive action. Effects may be delayed.	Flammable; evolves irritation or toxic fumes or gases in a fire; flashpoint 49 °C explosive limits 2.7–10.3%.	No open flames, no sparks, no smoking. Prevent skin and eye contact.	Reacts violently with boiling water, steam, strong oxidants, alcohols, amines, strong bases and many other compounds. Attacks many metals in presence of water.	

Formaldehyde solution (37–41% formaldehyde with 11–14% methanol) HCHO	Colourless liquid with a pungent odour; b.p. 96 °C; miscible with water.	Severely irritation of eyes and skin. Irritation of respiratory tract; prolonged exposure to the vapour may cause asthma-like symptoms, conjunctivitis, laryngitis, bronchitis or broncho-pneumonia. May cause sensitization by skin contact. Possible risk of irreversible health effects. Possible carcinogen.	Flashpoint 50 °C.	Wear protective clothing such as plastic apron rubber or plastic gloves and chemical-grade goggles. Work in fume cupboard or well-ventilated area.	Can react vigorously with oxidizers, with nitromethane to produce explosive products, with hydrochloric acid to produce the potent carcinogen *bis* (chloromethyl) ether.	Concentrated formaldehyde solutions become cloudy if stored below 21 °C and should be kept at 21–25 °C. Dilute solutions (1–5%) and medium-strength solutions (5–25%) retain many of the hazards of the concentrated form.
Glutaraldehyde $OHC(CH_2)_3CHO$	Colourless or pale yellow solution with pungent odour; m.p. −14 °C b.p. 188 °C;	Severe irritation of eyes and upper respiratory tract; prolonged inhalation exposure or skin contact		Work in fume cupboard or well-ventilated area. Wear rubber or plastic gloves and eye protection.	Can react vigorously with oxidizers.	Often supplied in aqueous solution at various concentrations with added stabiliser to

CHEMICAL	PHYSICAL PROPERTIES	HEALTH HAZARDS	FIRE HAZARDS	SAFETY PRECAUTIONS	INCOMPATIBLE CHEMICALS	OTHER HAZARDS
Silver nitrate $AgNO_3$	White crystals; m.p. 212 °C b.p. 444 °C; soluble in water.	May cause severe irritation and burns to eyes and skin. Corrosive by ingestion. May cause a red-blue discoloration of the skin on long-term or repeated exposure (argyria).	Not combustible but enhances combustion of other substances.	Prevent dispersion of dust. Observe strict hygiene. Wear protective rubber or plastic gloves, and face shield or eye protection in combination with respiratory protection. In case of contact with eyes, rinse with water and seek medical advice.	Ammoniacal solutions can precipitate explosive silver nitrite in the presence of base or glucose. Can form explosive products with ethanol and may cause explosive polymerization with acrylonitrile. May cause ignition of explosion if mixed with charcoal, magnesium, phosphorus or sulfur.	
Sodium azide N_3Na	Colourless crystalline solid; m.p. 300 °C; soluble in water.	Very toxic by ingestion, inhalation and skin contact, may cause burns. Dust and solution irritate eyes and skin; may be absorbed through skin.	Decomposes explosively when heated above its melting point. Gives off toxic fumes when heated; do not use water to extinguish fires.	In case of contact with skin, wash immediately. Do not inhale dust. Wear rubber or plastic gloves and eye protection.	Explosive reactions with bromine, carbon disulfide or chromyl chloride. Solid reacts with heavy metals including copper, lead and mercury to form explosive metal azide salts. On contact with acid, develops highly toxic and explosive gas.	
Sodium biselenite $NaHSeO_3$	Colourless, white crystalline powder; soluble in water.	Toxic by ingestion and inhalation of dust; possible danger of cumulative effects. Experimental teratogen. Prolonged skin contact may cause dermatitis.		Wear protective clothing.	Oxidizing agents.	

CHEMICAL	PHYSICAL PROPERTIES	HEALTH HAZARDS	FIRE HAZARDS	SAFETY PRECAUTIONS	INCOMPATIBLE CHEMICALS	OTHER HAZARDS
Perchloric acid $HClO_4$	Colourless liquid; miscible with water.	Corrosive; causes severe burns to eyes and skin and if ingested. Vapour is corrosive to eyes, skin, and respiratory tract. Inhalation of vapours may cause lung oedema.	Powerful oxidizing agent. Not combustible but enhances combustion of other substances.	Avoid breathing vapour and other exposure: wear protective clothing including nitrile gloves, eye and face protection. With hot solutions work in fume cupboard or hood.	Combustible materials and reducing agents: acetic anhydride, bismuth and its alloys, alcohol, metal, paper, wood and other organic materials.	Powerful oxidizing agent; may form explosive products if in contact with many inorganic and organic materials; contaminated wooden floors, benches, etc. May explode on percussion.
Phenol C_6H_5OH	Colourless or pale pink crystals with characteristic odour; m.p. 41 °C b.p. 182 °C; soluble in water.	Substance and vapours are corrosive to eyes, skin and respiratory tract causing severe burns; absorbed through skin. Central nervous system disturbance, coma. Kidney and liver damage. Symptoms include abdominal pain, vomiting, diarrhoea, skin irritation, eye pain. Prolonged contact with dilute solutions may cause dermatitis.	Flashpoint 80 °C flammable range 1.7–6%.	Do not breathe vapour; use respiratory protection. Avoid eye and skin contact. Work in fume cupboard. Wear nitrile gloves and eye protection. In case of contact with eyes, rinse immediately with water and seek medical advice; in case of contact with skin, remove any contaminated clothing and swab the contaminated area with glycerol, polyethylene glycol 300 or a mixture of liquid polyethylene glycol (70%) and methylated spirit (30%) and then flush with water.	Reacts with oxidants causing fire and explosion hazard.	

Sodium cyanide NaCN	White crystalline powder with almond odour; m.p. 563 °C b.p. 1496 °C; very soluble in water.	Extremely toxic by ingestion, inhalation and skin contact; severely irritating to eyes. May be absorbed through skin. Repeated exposure may affect thyroid.	May give off toxic fumes in a fire.	Do not inhale dust; use respiratory protection. Avoid eye and skin contact. In case of contact with skin, wash immediately with water and remove contaminated clothing. Wear chemical-grade goggles and rubber or plastic gloves. Keep in a securely locked, ventilated store.	Liberates extremely toxic hydrogen cyanide (HCN) gas on contact with acids or with water containing dissolved carbon dioxide. Can form explosive mixtures with nitrites.	Treat spillage of solutions with bleaching powder (sodium hypochlorite) and leave for 24 h. Sweep up solid spills carefully and add to water containing bleaching powder; leave for 24 h before discarding. Keep cyanide antidote kit available in the laboratory.
Sodium hydroxide NaOH	Colourless flakes, powder, pellets or sticks; m.p. 318 °C b.p. 1390 °C; soluble in water.	Solid and concentrated solutions. Inhalation of dust causes damage to respiratory tract, lung oedema. Corrosive by ingestion. Dilute solutions irritating to eyes or may cause severe damage if eye contact is prolonged.	Not combustible. Contact with moisture or water may generate sufficient heat to ignite combustible substances.	In case of contact with eyes rinse immediately and seek medical advice; in case of contact with skin wash immediately with water, remove contaminated clothing. Wear rubber or plastic gloves and eye protection even with dilute solutions.	Evolves large quantity of heat when mixed with water. Reacts vigorously with chloroform–methanol mixtures and with strong acids.	Store in well-sealed container in dry place.

CHEMICAL	PHYSICAL PROPERTIES	HEALTH HAZARDS	FIRE HAZARDS	SAFETY PRECAUTIONS	INCOMPATIBLE CHEMICALS	OTHER HAZARDS
Sodium hypochlorite solution (10–14% available chlorine) NaOCl	Colourless or pale yellow solution with chlorine odour; miscible with water.	Corrosive to eyes and skin; corrosive by ingestion and to respiratory tract; inhalation may cause lung oedema. Repeated exposure may cause skin sensitization.	Strong oxidant. May give off toxic fumes in a fire.	In case of contact with eyes, rinse immediately with water and seek medical advice; in case of contact with skin, wash immediately. Do not inhale vapour, use respiratory protection. Work in well-ventilated area. Wear rubber or plastic gloves and chemical-grade eye protection.	Liberates highly toxic gas in contact with acids. Can react vigorously with combustible and reducing compounds. May react with nitrogen compounds to form explosive N-chloro-compounds; may react violently with methanol.	Gradually loses chlorine during storage; dilute solutions used as disinfectant rapidly deteriorate. Store away from acids in a dark, cool, well-ventilated area.
Sulfuric acid H_2SO_4	Colourless, odourless viscous liquid; m.p. 10°C b.p. (decomposes) 340 °C.	Concentrated solution (15%) corrosive, causes severe burns, mist and vapour highly corrosive by inhalation, dilute solutions irritating to eyes and skin; cause burns and dermatitis.	May give off toxic fumes in a fire. Not combustible. Many reactions may cause fire or explosion. Dilution with water generates heat and spattering or boiling may occur. Always add acid to water, **never add water to acid.**	In case of contact with eyes rinse immediately and seek medical advice; in case of contact with skin wash immediately remove contaminated clothing. Wear nitrile gloves, eye and face protection. **No contact with flammable substances.**	Is a powerful oxidizing desiccant and reacts violently with many reagents including organic nitro compounds, potassium permanganate, alkali metals and perchlorates, combustible materials, oxidizers, amines, bases, water, excess heat and most metals.	Localized boiling may occur if concentrated acid is added to water.

CHEMICAL	PHYSICAL PROPERTIES	HEALTH HAZARDS	FIRE HAZARDS	SAFETY PRECAUTIONS	INCOMPATIBLE CHEMICALS	OTHER HAZARDS
Toluene C_7H_8 Methylbenzene	Colourless liquid with characteristic odour; m.p. −95 °C b.p. 111 °C; not miscible with water.	Central nervous system depressant. Irritation of eyes, mucous membranes, skin. Repeated exposure may cause toxicity in human reproduction or development.	Highly flammable; vapour may cause flash fire; flashpoint 4 °C flammable range 1.4–7%. Extinguishing media for a small fire: dry chemicals, carbon dioxide, foam, water fog or inert gas (nitrogen).	Keep container tightly closed; keep away from ignition sources; earth/(ground) containers to prevent static electrical discharge. Do not inhale vapour, use respiratory protection. Work in fume cupboard or well-ventilated area. Wear nitrile gloves.	Can react with strong acids, alkalis and oxidizers.	
Trichloroacetic acid CCl_3COOH	White hygroscopic crystals with pungent odour; m.p. 58 °C b.p. 197.5 °C; soluble in water, ethanol, diethylether.	Corrosive; causes severe burns to eyes, skin, respiratory tract.	Not combustible. May give off toxic fumes in fire.	Avoid contact with eyes and skin; wear rubber or plastic gloves and chemical-grade goggles or face shield in combination with respiratory protection. In case of contact with eyes, rinse immediately and seek medical advice.	Violent reaction with copper/dimethyl sulfoxide mixtures and on contact with bases, strong oxidizing agents and metals such as iron, zinc, aluminium.	Store in a dry place. Concentrated aqueous solutions may decompose violently.