مقاله مروری

Archive of SID

روش تولید، تکثیر و انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی و موشی

حسین بهاروند Ph.D. *،**، محمد پاکزاد B.Sc. *، عادله طائی B.Sc. *، سپیده ملامحمدی B.Sc. *، مهران رضائی M.Sc. *

* گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

* گروه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه علم و فرهنگ ACECR

تاریخ وصول: آبان ماه ۸۶ ، تاریخ پذیرش: دی ماه ۸۶

چکیده

پس از گذشت ۹ سال از تولید اولین رده سلولهای بنیادی جنینی انسان، مطالعات در زمینه زیست شناسی سلولهای انسانی به سرعت در حال پیشروی است. پتانسیل بالای این سلولها مسیر نوینی در راستای طب پیوند، توسعه داروسازی ، سم شناسی، زیست شناسی تکوینی انسان و تحقیقات در زمینه سرطان گشوده است. حصول این پتانسیل‌ها نیازمند درک جنبه‌های اصولی سلولهایhES شامل حفظ آنها در شرایط آزمایشگاهی کیفیت سلولها در حالت پر توانی وبهبود روشهای فن آور، پاساژو انجماد است .

تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی بر سلولهای مغذی فیبروبلاست موشی، روش ساده ومتداول برای تمرین تولید سلولهای hES است.در این فصل ،به روش قدم به قدم تولید سلولهای بنیادی جنینی انسانی و موشی، نگهداری، پاساژوانجماد آنها پرداخته می‌شود و در نهایت در مورد لزوم استانداردسازی روشهای کشت وتولید سلولهایhES بحث می‌شود.

کلید واژه‌ها: انجماد، سلولهای بنیادی جنینی، موش، انسان

مقدمه

بر خلاف سلولهای سوماتیک، سلولهای بنیادی جنینی انسانی[1] در شرایط آزمایشگاهی در حالت غیر تمایز یافته رشد می‌کنند.

این سلولها قادر به حفظ پـر تـوانی خـود در شـرایط موجـود زنده[2] و محیط آزمایـشگاهی[3] هـستند. از طـرف دیگـر دارای فعالیت تلومرازی بالایی بوده و در طی کشتهای طولانی مـدت طول تلومر خود را حفظ می‌کنند. بنابراین شده کـه سـلولهای hES منبع نامحدودی برای سلول درمـانی بیماریهـای ترمیمـی وابسته به سن مثل پارکینـسون ، آلزایمـر و جراحـات نخـاعی خواهند بود.

مکانیسمهایی که سلولهای بنیادی جنینی بـرای فـرار از پیـری، تنظیم چرخه سلولی، ترمیمDNA و فعالیـت تلـومرازی اتخـاذ می‌کنند با مکانیسمهای سلولهای بنیادی بزرگسالان و سرطانی متفاوت است.

یافته‌های اخیر بیانگر آن است که شبیه هر تقسیم سلولی دیگر، سلولهایhES طی کشتهای طولانی مدت دستخوش تغییرات ژنتیکی، اپی ژنتیکی ومیتوکندریایی می‌شوند. با این وجود ویژگیهای شاخص این سلولها پایدار می‌ماند. بنا به دارا

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان چهاد دانشگاهی، گروه سلولهای بنیادی، صندوق پستی ٤٦٤٤-١٩٣٩٥

E-mail: baharand50@yahoo.com

1- Human Embryonic Stem Cells (hES)
2- In vivo
3- In vitro

www.SID.ir

بودن این قابلیتها، مجموعه ای از ویژگیها را برای حالت تمایز نیافته hES در نظر می‌گیرند که نشان دهنده حالت پایدار این سلولها در هر آزمایشگاه است[۱].

اتخاذ روش مناسب برای تولید و نگهداری سلولهای hES، در حالت پایدار، طی کشتهای طولانی مدت یکی ازبزرگترین چالشهاست، محققین با طراحی سیستم‌های کشت مناسب در صدد رفع این مشکل هستند.

در این مقاله، روش تولید و نگهداری سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی به تفصیل بیان می‌شود.

فیبروبلاستهای جنین موش

برای تولید و کشت سلولهای بنیادی جنینی به یک بستر سلولی به نام سلولهای تغذیه کننده نیاز است. بدین منظور از سلولهای مختلفی استفاده می‌شود از آن جمله از فیبروبلاست‌های جنین موش[1]، یک رده نامیرا از فیبروبلاستهای موشی به نام دودمان STO، سلولهای کارسینومای مثانه انسانی ۵۶۳۷ و همچنین یک رده نامیرا از تخمدان‌هامستر چینی[2] به نام CHO برای این کار استفاده می‌شود. البته علاوه بر این سلولها سلولهای با منشاء انسانی زیادی به این منظور استفاده شده است.

اما به طور کلی سلولهای رایج تغذیه کننده ای که دراکثر مراکز تحقیقاتی استفاده می‌شود، فیبروبلاستهای جنین موش(MEFs) است که در گروه سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان نیز از این سلولها استفاده می‌شود که در زیر روش تهیه، کشت و نگهداری این سلولها آورده شده است.

تولید فیبروبلاست‌های جنین موش

روش کار محققان حاضر بر اساس روشAbbondanzo SJ و همکارنش درسال ۱۹۹۳ است. هر مرکز تحقیقاتی از نژاد خاصی از موش برای تولیدMEF استفاده می‌کند که دراین مرکز از موشهای نژاد NMRI استفاده می‌شود. همچنین لازم به ذکر است که از پاساژهای پایین MEF (معمولاً به طور متوسط تا پاساژ ٤) به این منظور استفاده می‌شود.

Archive of SID

مراحل کار به شرح زیر است:

۱) تعدادی موش ماده را درکنار موشهای نر بگذارید (معمولا دو موش ماده در کنار یک موش نر بالغ گذاشته می‌شود) روز بعد، موشهای ماده از نظر داشتن و یا نداشتن پلاک واژنی[3] بررسی شوند. پلاک واژنی بیانگر انجام جفت‌گیری است. روز مشاهده پلاک روز نیم آبستنی محسوب می‌شود. موشهای ماده جفت‌گیری کرده را جدا کرده و در قفس جداگانه بگذارید.

۲) در روز ۱۲/۵بارداری موشهای باردار را به طریق نخاعی کردن[4] بکشید (شکل۱–A.) حفره شکم را باز کنید و رحم حاوی جنینها را خارج نمایید و در یک ظرف حاوی PBS عاری از Ca2+/Mg2+ بگذارید (شکل ۱–B تا C). جنینها را از رحم خارج کنید و سپس کیسه زرده، آمنیون وجفت را از آن جدا کنید (شکل۱–D تا F). جنینها را دوبار دیگر با PBS عاری ازCa2+/Mg2+ تازه بشویید تا عاری از سلولهای خونی و ضایعات سلولی دیگر شوند.

۳) با استفاده از یک جفت فورسپس (پنست) ظریف سر را قطع کنید و کبد را خارج نمایید (شکل۱–G).

٤) تعداد ۸ـ۵ جنین مثله شده را در لوله یک سرنگ 5ml که دارای سوزنG ۱۸ است بگذارید.

۵) پیستون سرنگ را در سرنگ بگذارید و به مقدار ml ۲ از PBS عاری از Ca^{2+}/Mg^{2+} استریل یا محیط کشت سلولهای تغذیه‌کننده به آن اضافه کنید و سپس جنینها را ۵ــ۳ بار از سوزن رد کنید تا به قطعات کوچک تبدیل شوند سلولها را به یک فلاسک بزرگ cm^2 ۱۵۰ منتقل کنید(شکل ۱–H). سپس

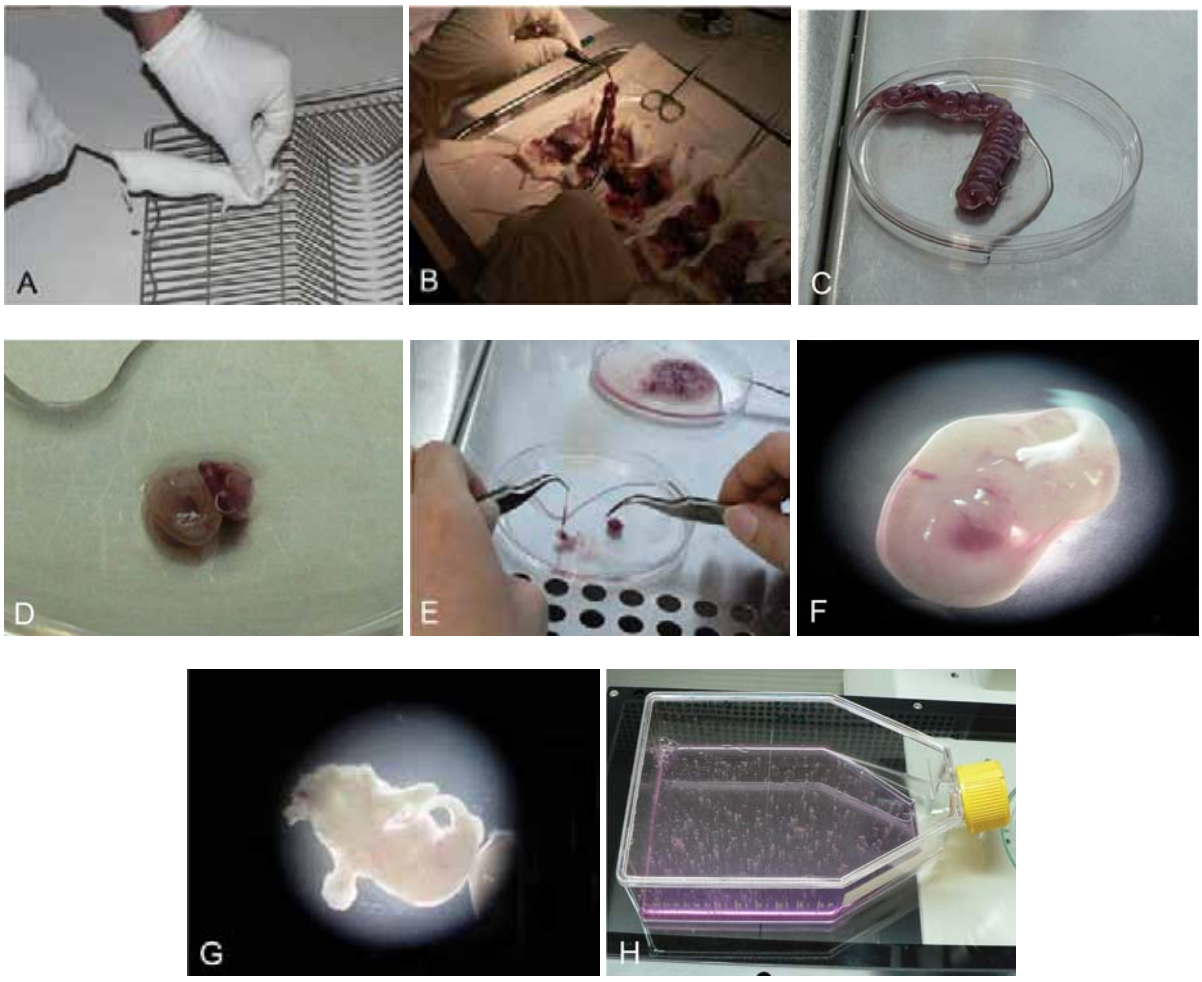
1- Mouse Embryonic Fibroblast; MEF
2- Chinese Hamster Ovary; CHO

3- Vaginal Plaque; VP
4 Cervical Dislocation

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰ml محیط کشت سلولهای تغذیه کننده به آناضافه کنید (طرز ساخت و محتوای محیط کشت سلولهای تغذیه کننده در پایان همین قسمت آمده است).فلاسک را به انکوباتور منتقل کنید. روز بعد تعویض محیط کنید تا ضایعات سلولی و قطعاتی که کف ظرف نچسبیده‌اند حذف شوند تقریبا مجموعه‌های سلولی به سرعت به فلاسک می‌چسبند و طی ۳ـ۲ روز سلولهای فیبروبلاستی اغلب ظرف را می‌پوشانند (شکل ۲) و تا روز سوم، کف ظرف کاملا پوشیده می‌شود (Confluent). لازم به ذکر است که واژه سلولهای تغذیه کننده فیبروبلاستی جنینی (Embryonic) که نحوه تولید آن بیان شد، یک ترمینولوژی گمراه کننده ولی مصطلح است زیرا در واقع این سلولها، سلولهای مزانشیمی اولیه هستند و نه فیبروبلاستهای بافت پیوندی و دوم اینکه، این سلولها مشتق از جنینهای (Fetus) میانه بارداری هستند و نه از جنین (Embryo) سوم اینکه در این سوپ سلولی، انواعی از سلولها مانند نورونها دیده می‌شوند که مهم نیست زیرا در پاساژهای بعدی اغلب آنها از بین می‌روند.



شکل ۱. مراحل تهیهMEF (A)نخاعی کردن(cervical dislocation) (B) باز کردن حفره شکم و خارج کردن رحم حاوی جنینها (C) رحم حاوی جنینها در یک ظرف حاوی PBS عاری از$Ca^{2}+/Mg^{2}$ (D) جنین خارج شده از رحم (E)جدا کردن کیسه زرده، آمینون وجفت از جنین (F) جنین جدا شده از کیسه زرده، آمینون وجفت (G) جنینی که سر و کبد آن برداشته شده (H) کشت explantهای حاصل

www.SID.ir

Archive of SID

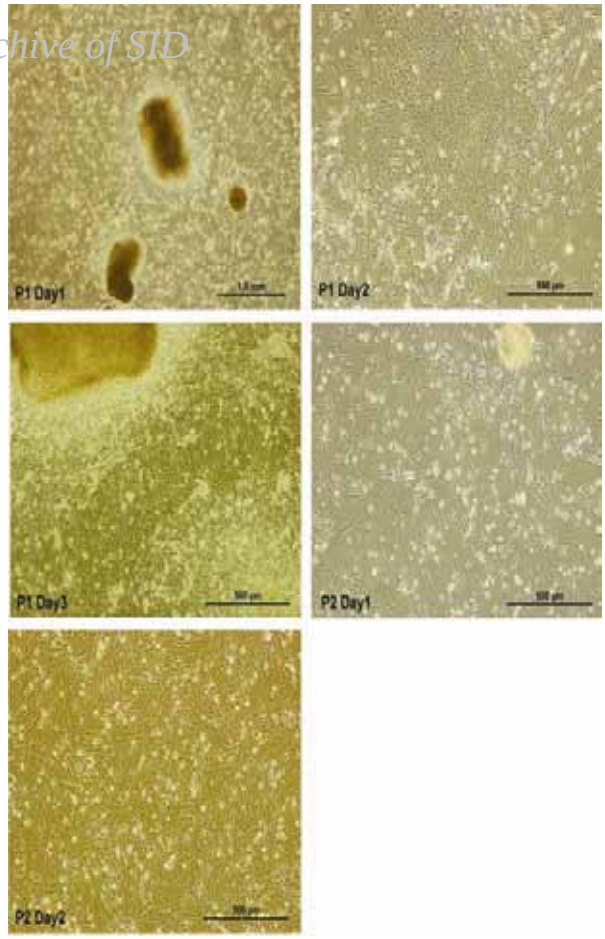
٦) کل محیط فلاسک را بکشید سپس فلاسک را دوبار با PBS عاری از Ca2+/Mg2+ بشویید (هربارml ۱۰) سپس محلول Trypsin/EDTA که قبلا گرم شده است را به آن اضافه نمایید، سه دقیقه در دمای آزمایشگاه بگذارید و سپس دو تا سه ضربه به طرفین ظرف بزنید. به آنml ۱۰محیط کشت سلولهای تغذیه‌کننده اضافه کنید تا آنزیم خنثی شود. سپس محتوای فلاسک را که اکنون ml ۱۵ است به ۳ فلاسک بزرگ دیگر منتقل کنید و حجم هر فلاسک را با محیط کشت سلولهای تغذیه کننده به ۲۰ml برسانید. این اولین پاساژ است. بهترین پاساژها برای کشت سلولهای بنیادی جنینی ٤ پاساژ اول است. بعد از آن سلولهای تغذیه کننده دارای کفایت لازم برای پشتیبانی از سلولهای بنیادی‌جنینی نیستند.

۷) وقتی که به اندازه کافی سلولهای تغذیه کننده کشت داده شد یا می‌توان همان زمان از آنها استفاده کرد یا آنها را تا زمان لازم منجمد کرده و در نیتروژن مایع نگهداری نمود. (روش انجماد و ذوب آنها مانند انجماد و ذوب سلولهای بنیادی جنینی موشی است که بعدا ذکر خواهد شد). معمولا بهتر است که سلولهای تغذیه کننده را در پاساژدوم منجمد نمود. (نحوه پاساژ فیبروبلاستهای جنین موشی در ادامه خواهد آمد).

ترکیبات محیط کشت سلولهای فیبروبلاستی جنین موش در جدول ۱ آمده است.

جدول۲ . ترکیبات محیط کشت سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

ترکیبات	مقدار
Deionized water	۸۳۷ ml
DMEM powder (+pyr)	۱۳/۵ gr
NaHCo3	۳/۷ gr
Pen/Strep	۱۰ ml
B-ME	۷µl
FBS	۱۵۰ml
pH Adjustment	۴/۲-۴/۷



شکل۲. کشت explant جنینهای سیزده روزه موش. به مهاجرت سلولها ازexplant ها توجه کنید (P =پاساژ)

انجماد سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

برای انجماد سلولهای MEF یک فلاسک بزرگ ۱۵۰cm2 به روش زیر عمل کنید:

۱) محیط روی سلولها را بردارید.

۲) دوبار سلولها را با PBS عاری از Ca2+ و Mg2+ بشویید.

۳) ۵ml محلول Trypsin/EDTAاضافه کنید و مدت ۳ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهدارید.

٤) بعد از گذشت ۱/۵ دقیقه چند ضربه به کناره های فلاسک بزنید تا سلولها کامل از کف ظرف جدا شوند.

۵) با افزودن ۱۰ml محیط کشت سلولهای تغذیه کننده، آنزیم را خنثی کنید.

٦) چند بار سوسپانسیون را پیپت کنید تا سلولها به صورت

www.SID.ir

Archive of SID

تک سلولی در آیند.

۷) سوسپانسیون حاصل را بر دارید و به مدت ۸ دقیقه با دورrpm ۸۰۰ ، سانتریفوژ کنید.

۸) محیط رویی را بکشید و با زدن چند ضربه آرام پلاک سلولی را حل کنید .

۹) معمولاً محتویات لوله را به سه تا پنج ویال منتقل می‌کنند. بنابراین ml ۵ـ۳ محیط انجماد سرد شده به لوله اضافه کرده و سلولها را به آرامی پیپت کنید (روش تهیه محلول انجماد در ادامه همین بخش آمده است).

۱۰) روی لوله‌های انجماد با ماژیک مخصوص مشخصات سلولها شامل نام، تعداد پاساژ، تاریخ انجماد و فاکتور رقت انجماد یعنی چه تعداد ویال از چه ظرفی تهیه شده است، را بنویسید.

۱۱) به هر لوله انجماد ml ۱ از سوسپانسیون سلولی اضافه شود.

۱۲) لوله‌های انجماد را به ظرف انجماد[1] که از قبل در یخچال ٤ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود منتقل کنید و سپس ظرف مزبور را بلافاصله به فریزر ۷۰- درجه سانتی گراد منتقل کنید. تحت این شرایط فرض بر این است که سلولها با سرعت ۱- درجه سانتی گراد در دقیقه سرد و منجمد می‌شوند.

۱۳) پس از یک شب یعنی روز بعد، لوله های انجماد حاوی سلولها را به تانک نیتروژن منتقل‌کنید.

۱٤) مشخصات سلولها و آدرس آنها شامل شماره تانک، شماره holder و شماره rack در دفترمخصوص تانک نیتروژن نوشته شود.

محلول انجماد سلولهای فیبروبلاستی جنین موش (MEF)

۱) سرم جنین گاوی(FCS) ۵۰ درصد

۲) محیط کشت سلولهای تغذیه کننده ٤۰ درصد

۳) دی متیل سولفوکسید DMSO[2] ۱۰درصد

الف) این محلول همواره به صورت تازه تهیه شود

ب) پس از تهیه آن، حتما باید آن را در ظرف حاوی یخ نگهداری کرد و قبل از اضافه کردن آن به سلولها باید محلول مزبور سرد باشد درغیر این صورت DMSO تبخیر می‌شود.

ذوب سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

۱) ml ۱۹ محیط کشت سلولهای تغذیه کننده در یک فلاسک بزرگ (۱۵۰ سانتی متر مربع) بریزید (دمای اتاق) ودر ظرف را ببندید.

۲) آدرس سلولهای MEF را از دفتر انجماد سلولی مشخص کنید.

۳)holder را اندکی از نیتروژن خارج کنید تا بتوان rack مورد نظر را گرفت، سپس با فورسپس، سرویال را گرفته و آن را قفل کنید. درضمن مشخصات آن را با آدرس مطابقت کنید.

٤) سلولها را در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد بگذارید تا ذوب شوند، ولی دقت کنید تا اندکی یخ باقی مانده باشد.

۵) سطح ویال را با اتانول ۷۰ درصد بشویید.

٦) ویال را به زیر هود منتقل کنید و در آن را باز نمایید.

۷) با استفاده از یک پیپت ml ۲ محتویات ویال را به فلاسکی که از قبل تهیه نموده‌اید، منتقل کنید.

دقت کنید نیازی به شستشوی سلولها نیست، زیرا DMSO در دمای۳۷ درجه سانتی گراد تبخیر شده و از ظرف خارج می‌شود. پس از ٤ـ۳ روز سلولها کف ظرف را می‌پوشانند. طی این مدت نیازی به تعویض محیط نیست.

پاساژ سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

معمولا سلولهای یک فلاسک بزرگ به ۵ـ۳ فلاسک بزرگ منتقل می‌شوند. ولی سه ظرف بهتر است.پاساژ سلولی به

1- Cryocooler
2- Dimethyl Sulphoxide; DMSO

www.SID.ir

Archive of SID

منظور تکثیر سلولها انجام میشود. مراحل این فرآیند عبارتند از:

۱) محیط کشت روی سلولها را بکشید.

۲) دوبار سلولها را با PBS عاری از +Ca2 و +Mg2 بشویید.

۳) ۵ml محلول Trypsin/EDTA اضافه کنید و فلاسک را در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه نگهدارید .

٤) برای جداسازی کامل سلولها چند ضربه به کناره های فلاسک بزنید.

۵) ml ۱۰ محیط کشت سلولهای تغذیه کننده برای خنثی کردن آنزیم اضافه کنید و سوسپانسیون حاصل را پیپت کنید.

٦) به هر فلاسک جدید ml ۵ از سوسپانسیون سلولی اضافه کنید.

۷) ml ۵ دیگر محیط کشت سلولهای تغذیه کننده، به هر فلاسک بزرگ حاوی سوسپانسیون سلولهای فوق اضافه نمایید.

۸) فلاسک را به انکوباتورمنتقل کنید.

۹) طی ٤ـ۳ روز سلولها کف ظرف را کاملاً می‌پوشانند.

تیمار فیبروبلاستهای جنین موش با مایتومایسینC

به منظور استفاده از MEF به عنوان سلولهای تغذیه کننده سلولهای بنیادی جنینی ، لازم است در ابتدا، تکثیر آنها را متوقف کرد تاتنها بتوانند فعالیت متابولیکی داشته باشند و از سلولهای بنیادی جنینی حمایت نمایند ولی تقسیم نشوند. دو روش برای این کار انجام می‌شود استفاده از اشعه گاما و استفاده از مایتومایسین Cکه در آزمایشگاه ما از مایتومایسین Cاستفاده می‌شود.

مایتومایسین C بین دو رشته DNA قرارمی‌گیرد و از جدا شدن آنها طی فاز S اینترفاز جلوگیری می‌کند و بنابراین تقسیم سلولی متوقف می‌شود.

روش کار به شکل زیر است :

۱) مایتومایسینC که ظرف آن حاوی ۲mg مایتومایسین است را تهیه نمایید.

۲) ml ۱ آب بدون یون استریل به آن اضافه نمایید (۲mg/ml).

۳) محتویات آن را به یک لوله اپندرف استریل منتقل کنید. دقت کنید که مایتومایسین فوق العاده سمی است و در ضمن به نور حساس است و همواره باید آن را در تاریکی نگهداری کرد.

٤) آن را در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری کنید.

۵) هنگام استفاده آن را ذوب کنید. ممکن است که رسوباتی را مشاهده نمایید، تنها آن را به هم بزنید و به مقدار نیاز بردارید.

٦) غلظت نهایی مورد استفاده ۱۰µg/ml است. بنابراین به هر فلاسک بزرگ حاویml ۲۰ محیط کشت، مقدار µl ۱۰۰ از محلول mg/ml ۲ اضافه نمایید و فلاسک را به انکوباتور برگردانید و به مدت ۳ـ۱/۵ ساعت بگذارید. معمولا۱/۵ ساعت زمان مناسبی است. با این عمل تقسیم سلولهای تغذیه کننده به طور دائم متوقف می‌شود.

۷) بعد از۱/۵ ساعت، محیط دارای مایتومایسین C را بردارید و سه بار فلاسک بزرگ را با PBS عاری از +Ca2 و +Mg2 بشویید (هر بار ml ۱۰). سپسml ۵ محلولTrypsin/EDTA اضافه کنید (۳ دقیقه). با زدن دو یا سه ضربه به‌پهلوی فلاسک، سلولها را کاملا جدا نمایید و به مقدار لازم محیط کشت سلولهای تغذیه کننده اضافه نمایید.

۸) برای پوشاندن کف ظرفهای مورد نیازتان می‌توانید دو کار انجام دهید، یا بر اساس نسبت سطح به سطح سلولها را به ظرفهایتان منتقل کنید، برای مثال فلاسکی با سطح cm2 ۱۵۰ معادل ٦ فلاسک با سطح cm2 ۲۵ است یا اینکه با شمارش سلول در نهایت به هرcm2 از ظرفهایتان ۳۰۰۰ سلول منتقل کنید تا کف آنها پوشیده شود.

www.SID.ir

ظرف مدت کوتاهی سلولهای MEF به کف ظرف می‌چسبند و کف ظرف را به صورت تک‌لایه پرمی‌کنند. ۱۲ـ٦ ساعت بعد، سلولهای مزبور آماده استفاده می‌باشند. ولی بهتر آن است که آنها را برای یک شب بگذارید و روز بعد از آنها استفاده کنید. این سلولها تا دوهفته قابل استفاده هستند و اگر ظرف‌این مدت از آنها استفاده نشود باید دور انداخته شوند.

نکتهٔ قابل ذکر اینکه، هر چقدر این سلولها بیشتر بمانند ماتریکس برون سلولی قطورتری می‌سازند که زمان تریپسینه کردن سلولها را بالا می‌برد.

مراحل تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی

روشهای متعددی برای تولید سلولهای ES از ICM بلاستوسیست ارایه شده است که تمام آنها مشابه هستند و تفاوت اندکی در آنها وجود دارد [٤-۲] البته در بعضی از مراحل تغییراتی داده شده که مرحله به مرحله ذکر می‌شود.

I) اخذ بلاستوسیست از موشهای ماده سه و نیم روزه

ظروف مورد نیاز عبارتند از :

Center-Well، برای کشت بلاستوسیست و اولین پاساژ کلونیهای شبه ESC

96 Well تـه صاف، برای کشت ICM و پاساژ اول و دوم سلولهای ICM موشی

24 Well یا 4، برای دومین پاساژ کلونیهای شبهESC موشی

فلاسک-T-25، برای کشت کلونیهایESC موشی

لازم به ذکر است، قبل از استفاده از ظروف پوشیده شده با MEFباید آنها را زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار دهید ومحیط کشت آنها را که محیط کشت سلولهای تغذیه کننده است با محیط مخصوص سلولهای بنیادی تعویض کنید.

Archive of SID

۱) به هر موش ماده ۷/۵ واحد هورمون گنادوتروپین مشتق از سرم مادیان باردار[1] تزریق کنید.

۲) ٤٦ـ٤٨ ساعت بعد از تزریق PMSG ، هورمون کوریونی انسانی[2] به میزان ۷/۵ واحد به هرموش تزریق شود و هر دو موش ماده را در کنار یک موش نر قرار دهید.

۳) روز بعد از تزریق HCG ، پلاک واژنی را بررسی کنید، موشهای ماده دارای پلاک واژنی را در قفس جداگانه‌ای جمع‌کنید. این روز، روز نیم بارداری در نظر گرفته می‌شود.

٤) ۳/۵ روز پس از مشاهده پلاک واژنی، زمان مناسب برای گرفتن جنین در مرحله بلاستوسیست است. بدین منظور ابتدا محیط کشت سلولهای تغذیه کننده داخلCenter-Well را با محیط کشت ESC که حاوی LIF ۵۰۰۰ IU/mlاست تعویض کنید.سپس کف دیش ۳۵ mm^2 قطرات ۳۰ µl با محیط کشت ESC که حاوی LIF۵۰۰۰ iu/ml گذاشته و روی قطرات را با mineral oil بپوشانید.

۵) موشهای ماده را به روش قطع نخاعی بکشید و دو شاخ رحم را که از ناحیه واژن به هم متصل بودند بریده و مزانتری آن را نیزجدا کنید و داخل پتری دیش ۳۵mm^2 حاوی محیط T6 قرار دهید.

٦) یک سرنگ انسولین بردارید و از محیط کشت T6 دارای BSA ، ٤mg/ml پر کنید و سر آن را کمی خم کنید. زیر استریو میکروسکوپ در دوسر شاخ رحم با قیچی بریدگی کوچکی ایجاد و با سرنگ انسولین از ناحیه واژن محیط را وارد کنید، که در این حالت از طرف دیگر رحم بلاستوسیست‌ها خارج می‌شوند (به این روش فلاش کردن می‌گویند).

جنینها را بعد از هر فلاش داخل قطراتµl ۳۰ انتقال دهید و انکوبه کنید.

1- PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
2- HCG: Human chorionic gonadotrophin

www.SID.ir

II) اخذ بلاستوسیستهای ۵ تا ۷ روزهٔ انسانی

بلاستوسیستهای انسانی که برای کارهای تحقیقاتی استفاده می‌شوند جنینهایی با رتبه های پایین هستند که با روشهای IVF در آزمایشگاههای درمان ناباروری تولید می‌شوند.

تولید سلولهای بنیادی جنینی

تولید سلولهای بنیادی جنینی ازموش یا انسان ، یک فرایند چند مرحله‌ای است که به طور شاخص شامل مراحل زیر است:

جداسازی توده سلولی داخلی (ICM) از تروفواکتودرم جنین در مرحله بلاستوسیست (قبل از لانه گزینی)

بسیاری از عوامل دخیل در جداسازی ICM برای تولید رده سلولی بنیادی جنینی هنوز به طور کامل شناخته نشده اند. برخی از این عوامل عبارتند از؛ مرحله جنین مورد استفاده، روش فریز و ذوب آن، مدت زمانی که جنین کشت شده تا به مرحله بلاستوسیست رسیده، شرایط کشت، چگونگی کیفیت ICM و تروفواکتودرم. به طورکلی جداسازی ICM از بلاستوسیست به روش کلاسیک با دو تکنیک جراحی ایمنی و روش مکانیکی صورت می‌گیرد که هر دوروش در تولید سلولهای بنیادی جنینی انسانی و موشی کاربرد دارد. لازم به ذکر است که روشهای دیگری همچون روشهای استفاده از تک بلاستومر، انتقال هسته و انتقال هسته تغییریافته در تولید سلولهای بنیادی جنینی نیز استفاده می‌شود.

جراحی ایمنی[1]

کلیات انجام این روش توسط Knowles وSolter در سال ۱۹۷۵ ارایه شد ، که شامل برداشتن ناحیه شفاف[2] (زونا پلاسیدا) با استفاده ازمحلول اسیدتایرود ، انکوباسیون جنین در آنتی بادی (که دراینجا آنتی بادی به سلولهای تروفواکتودرمی که در سطح قرار دارند متصل می‌شوند و نه بهICM که در قسمت داخل است) و سپس لیز کردن سلولهای تروفواکتودرم توسط فعال سازی آنتی بادی در کنار کمپلمان و در نهایت پیپت کردن ساده جنین برای جداسازی سلولهای لیز شده اطراف ICM تا باقی ماندن ICM.

ICM جداشده حاصل، برسلولهای تغذیه کننده (MEF) کشت داده می‌شود که در مرحله (۲) توضیح داده می‌شود.

زمان مناسب برای انجام این فرایند به صورت تجربی تعیین می‌شود که معمولاً برای جنینهای انسانی بین ۵ تا ۷ روز و برای جنینهای موشی ۵ /۳ تا ٤ روز است.

نکته قابل توجه دیگر این است که ، جنینهایی برای این کار مناسب اند که در حال تشکیل حفره بلاستوسل اند وتروفواکتودرم نسبتاً دست نخورده ای دارند. در غیر این صورت باید با روش مکانیکی ICM را جدا کرد که توضیح داده می‌شود.

مواد مورد نیاز

- اسید تایرود (طرز ساخت در ضمیمه ٤)
- آنتی بادی علیه سرم انسانی[3]

محتوای هر ویال آنتی بادی را بر اساس مقدار مورد استفاده در هر مرحله، در میکروتیوبهای جداگانه تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید، هنگام استفاده با محیط کشت جداسازی hESC به نسبت ۱:۳ رقیق و قطره گذاری نمایید (برای جراحی ایمنی جنین انسانی)

● آنتی بادی علیه سرم موشی

محتوای هر ویال آنتی بادی را بر اساس مقدار مورد استفاده

1- Immunosurgery
2- Zona pellucida
3- Antihuman whole seum antibody

Archive of SID
www.SID.ir

Archive of SID

در هر مرحله، در میکروتیوبهای جداگانه تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید، هنگام استفاده با محیط کشت جداسازی mESCs به نسبت ۱:۳ رقیق و قطره گذاری نمایید (برای جراحی ایمنی جنین موشی)

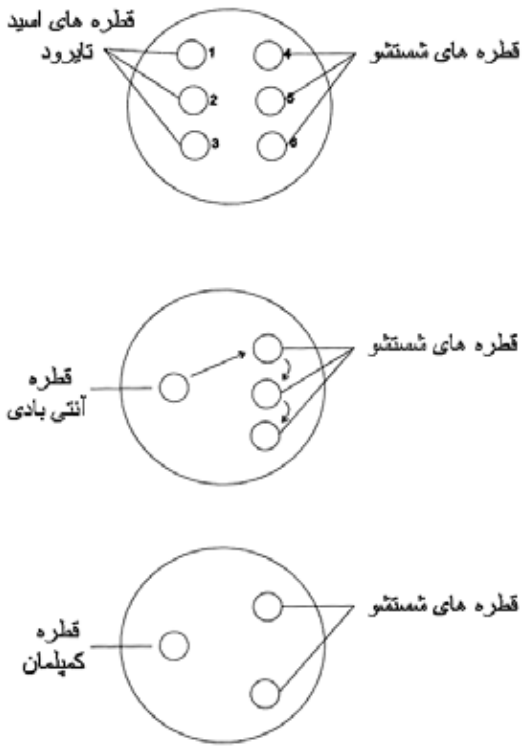
● کمپلمان خوکچهٔ هندی[1]

محتوای هر ویال کمپلمان را بر اساس مقدار مورد استفاده در هر مرحله، در میکروتیوبهای جداگانه تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید ، هنگام استفاده با محیط کشت جداسازی hESC یا mESC به نسبت ۱:۱۰ رقیق و قطره گذاری نمایید پیپت پاستور پردازش شده پیپت پاستور را روی شعله نگه دارید تا گرم شود و سپس یکنواخت آن را بکشید تا نازک شود (به اندازه‌ای نازک شود که تقریباً به قطر ICM در آید) به طوری که بتوان با آن سلولهای تروفواکتودرم را جدا کرد.

روش انجام کار

۱- دراین فرایند هرجنین جداگانه پردازش می‌شود (البته در مورد جنینهای موشی تا مرحله کشت می‌توان تا ۱۰ جنین نیز با هم کار کرد). برای انجام این فرایند به یک سری دیش‌های قطره گذاری شده نیاز است که در شکل ۳ آمده است. اندازه هر قطره µl ۳۰ است. پس از قطره گذاری مطابق شکل روی قطره ها را با روغن معدنی تست شده بپوشانید و سپس این ظرف ها را به مدت یک ساعت در انکوباتور CO_2 دار قرار دهید تا از لحاظ دما و pH به تعادل برسد.(استثنا: چون کمپلمان خیلی ناپایدار است باید بلافاصله قبل از استفاده قطره گذاری شود).

۲- در زیر استریومیکروسکوپ جنین را به کمک پیپت هدایت شونده توسط دهان به اولین قطره اسید تایرود ببرید و خیلی سریع جنین را از دو قطره بعدی اسید تایرود عبور دهید. دراینجا ناحیه شفاف کاملاً حل می‌شود و ممکن است در قطره آخر کف ظرف بچسبد که باید به آرامی با پیپت کردن آن را جدا کرد. سپس این جنین به قطره های شستشو منتقل می‌شود.



شکل۳. قطره‌گذاری برای انجام جراحی ایمنی

۳- جنین حاصل که فاقد ناحیه شفاف است را به قطره آنتی بادی منتقل کنید و بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جنین را به قطره های شستشو ببرید و در هر قطره ۳ الی ۵ دقیقه زمان بگیرید. (در این مرحله برای جنین انسانی آنتی بادی علیه سلولهای انسانی و برای جنین موش آنتی بادی علیه سلولهای موشی استفاده شود).

٤- جنین را به قطره حاوی کمپلمان منتقل کنید و بعد از

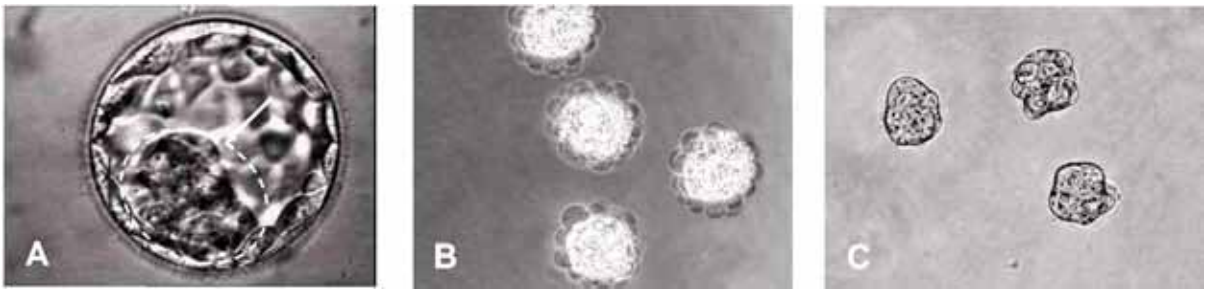
1- Guinea pig complement

www.SID.ir

Archive of SID

۱۵دقیقه انکوباسیون جنین رامشاهده کنید، اگر ابزارهای ایمنی (سیستم کمپلمان و آنتی بادی) به خوبی عمل کرده باشند، سلولهای تروفوبلاستی به شکل بادکنکی و بادکرده دیده می‌شوند که نشان از لیز شدن این سلولها است (شکل٤). اگر سلولهای تروفوبلاستی به شکل بادکنکی در نیامده باشند می‌بایست به انکوباسیون ادامه دهید و هر ۵ دقیقه یک بار آنها را مشاهده کنید و زمانی که سلولهای لیز شده جدید دیدید جنین را در قطره های جداسازی (قطره های شستشو) شستشو دهید. بایدتوجه داشت که زمان انکوباسیون کمپلمان نباید بیش از ۳۰ دقیقه باشد. جنین را به آرامی پیپت کنید (همان طور که گفته شد قطر پیپت باید حدوداً هم اندازه ICM باشد تا سلولهای لیز شده تروفواکتودرم از ICM جدا شوند).

۵- ICM را در قطره های محیط حاوی سرم شستشو دهید (مرحله ۲ انجام شود).



شکل٤. (A)جنین در مرحله بلاستوسیست (پیکان ICM را نشان می‌دهد) (B) بلاستوسیست های تیمار شده با کمپلمان (C) ICM های جدا شده

روش مکانیکی

همان طور که گفته شد جنین هایی که تروفواکتودرم سالمی ندارند انتخاب خوبی برای این روش هستند. بلاستوسیست ها بر اساس اندازه توده سلولی داخلی شان رتبه بندی می‌شوند و طبق این رتبه بندی کل جنین و یا بخشی از آن کشت داده می‌شود. دراین روش پس از کشت بلاستوسیت روی MEF و چسبیدن جنین به کف ظرف سلولهای تروفواکتودرم به صورت دو بعدی در سطح شروع به رشد می‌کنند ولی سلولهای ICM به صورت سه بعدی به سمت بالا تکثیر می‌یابند که معمولاً بعداز ۳ الی ۵ روز (برای جنینهای موشی) ۵ الی۷ روز (برای جنینهای انسانی) به صورت یک برآمدگی گنبدی شکل دیده می‌شوند که دراین هنگام با کمک یک پیپت (که قبلاً آنرا روی شعله نازک کرده‌ایم) می‌توان به راحتی ICM را از تروفواکتودرم جدا کرد. باید توجه داشت که به همراه ICM تعدادی از سلولهای تروفواکتودرم نیز جدامی شوند که در کشت های بعدی خالص سازی می‌شود.

کشت ICM

ICM حاصل را در ظرفی که کف آن با سلولهای تغذیه کننده غیر فعال شده (از لحاظ تقسیم) پوشانده شده است کشت دهید، ICM حدوداً تا ٢٤ ساعت بعد به سلولهای تغذیه کننده می‌چسبد. درتمامی موارد ، تقسیم سلولهای تغذیه کننده را قبل از هم کشتی با سلولهای بنیادی جنینی متوقف می‌کنند (که قبلاً به طور مفصل شرح داده شده).

چون بعد از رشد ICM در مورد جنین های انسانی باید به روش مکانیکی ICM را چند قطعه کنید، بهتر است ICM انسانی در ظرفهای پهن مثل ظرفهای چهارخانه کشت شوند، اما در مورد جنینهای موشی چون هم تعداد زیاد است و هم پراکنده کردن به روش آنزیمی است ظرف ۹٦خانه بهتر است (هر ICM در یک خانه از پلیت ۹٦ خانه پوشیده شده با MEF

www.SID.ir

Archive of SID

کشت داده شود).

همان طور که قبلا نیز گفته شد سلولهای رایج تغذیه کننده، فیبروبلاست های جنین موشMEF هستند (که قابل ذکر است که MEF دراینجا تأمین کننده برخی مواد ناشناخته مورد نیاز سلولهای بنیادی جنینی و همچنین فراهم کننده غشای پایه‌ای (ECM)[1] برای چسبیدن سلولها به کف ظرف است).

اخیراً برخی محققین که در راستای کشت سلولهای بنیادی در شرایط عاری از مشتقات حیوانی[2] کار می‌کنند، موفق به کشت ICM بر بسترهایی مشتق از منابع انسانی روی آورده و رده سلولی تولید کرده‌اند، که در ادامه مروری نیز بر این روشها خواهیم داشت.

پراکنده کردن ICM[3]

ICM های موشی: به روش زیر می‌توانید این کار را انجام دهید :

۱) چهار روز پس از کشت بلاستوسیست, ICMرا از تروفوبلاست به کمک پیپت پاستور جدا کنید ودر دیش ۹۶ خانه پوشیده شده با فیبروبلاست مایتومایسینه کشت دهید.

۲) روز بعد، سلولهای ICM را منفرد کنید. به این ترتیب که، محیط روی سلولها را حذف کنید، ۲ بار با -PBS شستشو دهید، ۷۰µl ، Trypsin-EDTA به سلولها اضافه کنید، بعد از گذشت ۱/۵ دقیقه به کمک سمپلر، ٤٠ بار پیپت کنید تا سلولهای ICM از هم جدا شوند. بعد از گذشت ۳ دقیقه از تیمار سلولها با تریسپین، ۷۰µl محیط ESC به منظور خنثی شدن آنزیم اضافه کنید،چندین بار دیگر عمل پیپت کردن را انجام دهید.

۳) سوسپانسیون سلولی حاصل را در پلیت ۹۶ خانه دیگری که از سلولهای MEF مایتومایسینه پوشیده شده کشت دهید.

ICM های انسانی: در مراحل اولیه تولید، ضروری است که کلونی تشکیل شده از ICM کشت شده را به ۲ الی ۳ قطعه برش دهید و در ظرفی هم سطح یا با سطح بیشتر منتقل کنید. اگر تنها تعداد کمی قطعه وجود داشته باشد (۵-۱)، باید آنها را در ظرف کشت جدید نزدیک هم قرار دهید. البته باید توجه کردکه فضای کافی برای رشد داشته باشند. بهتر است قبل از آنکه لبه کلونی ها با هم تماس پیدا کنند وهمچنین قبل از اینکه نشانه های تمایز در آنها مشاهده شود پراکنده شوند.

وقتی کلونیها به آهستگی رشد می‌کنند ، دو – سوم محیطش را هر ۲ الی۳ روز تعویض کنید تا درتمام مدت حالت آن حفظ شود. برای کلونیهای بهتر و بیشتر ، هر روز دو- سوم محیط تعویض شد.

حصول سلولهای بنیادی جنینی از سلولهای موشی

۱) حدود هفت روز پس از پاساژ سلولهای ICM , خانه‌های دارای سلولهای تمایز نیافته را با آنزیم Trypsin/EDTA تیمار و منفرد کنید و دردیش ۹۶ خانه دیگری پوشیده شده با فیبروبلاستهای مایتومایسینه پاساژ دهید.

۲) حدود دو روز بعد از پاساژ، اولین کلونیهای شبیه سلولهایES4 ظاهر می‌شود (شکل۵) که برای ازدیاد، باید پاساژ دهید و در ظرفCenter-Wellپوشیده شده با فیبروبلاست مایتومایسینه کشت دهید.

۳) حدود ٤٨ ساعت بعد، کلونی های موجود در Center-Well به یک خانه از ظرف ٦-خانه پوشیده شده با فیبروبلاست پاساژ دهید.

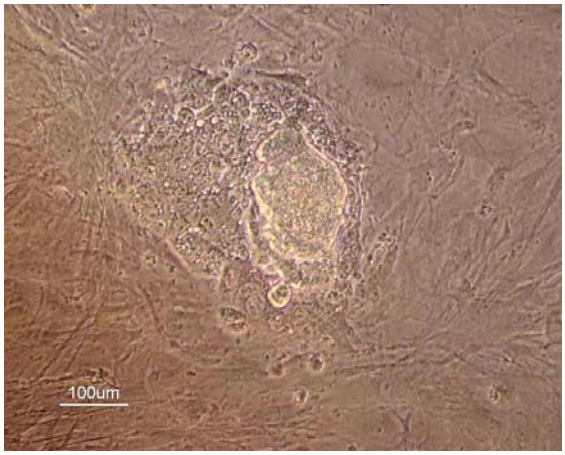
1- Extra-Cellular Matrix; ECM
2- Xeno-free culture
3- ICM Dispersion

4 ES cell like

www.SID.ir

٤) حدود ٤٨ ساعت بعد، کلونیهای ESC موجود در ظرف ٦-خانه به فلاسک۲۵cm2 (T-25) پوشیده از یک لایه سلولهای تغذیه‌کننده ماتیومایسینه، انتقال داده دهید .

اولین کشت در فلاسک T-25 معادل اولین پاساژ 1(P1) در نظر گرفته می‌شود و از این مرحله به بعد غلظت LIF را به 1000IU/ml کاهش دهید. در تمامی موارد ذکر شده از محیط کشت ESC استفاده کنید.



شکل ۵. ICM و تروفواکتودرم چسبیده به سلولهای MEF را نشان می‌دهد. همان طور که مشخص است تروفواکتودرم به صورت دوبعدی و ICM به صورت سه بعدی رشد کره است.

سلولهای انسانی

با تکرار مرحله قبل بعد از ٦ الی ٨ روز کلونیهایی با مورفولوژی شاخص کلونیهای hESC به دست می آید، که بعد از این هر ٦ الی ٨ روز باید آنها را پاساژ دهید. نکته قابل توجه آن است که می توان آنها را به مدت طولانی کشت داد یا برای سالها منجمد نگاه داشت (که در قسمت بعدی توضیح داده می شود) در شرایط مطلوب، حتی این سلولها میتوانند حالت غیر تمایزی و کاریوتایپ طبیعی خود را برای سالها حفظ کنند.

Archive of SID

روش بهینهٔ تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی

یکی از دغدغه های اکثر مراکز تحقیقاتی تولید ردهٔ سلولی از موشهای ترانس ژن است. روشهایی که تاکنون برای تولید رده های سلولی استفاده شده است زمان بر و با بازدهی نامعلوم است (که احتمالاً به دلیل استفاده از مواد و تجهیزات گوناگون در آزمایشگاههای مختلف است).

در همین راستا دانشمندان موسسه کارولینا توانسته اند با یک سری تغییرات در روشهای قدیمی روش جدیدی ابداع کنند که در آن، مدت زمان تولید ردهٔ سلولی ۱۵ تا ۲۰ روز و بازدهی روش حدود ۵۰ درصد گزارش شده است [۵].

نکات و مراحل انجام این روش در شکل ٦ آورده شده است.

۱- در این روش به جای استفاده از پاساژهای ۵-۳ روزهٔ MEF که قبلاً استفاده می شد، از پاساژ های اول یا دوم استفاده شده، چرا که پاساژهای بالاترMEF زودتر به پیری می رسند و در کل قدرت کمی برای پشتیبانی از تولید ردهٔ سلولی دارند.

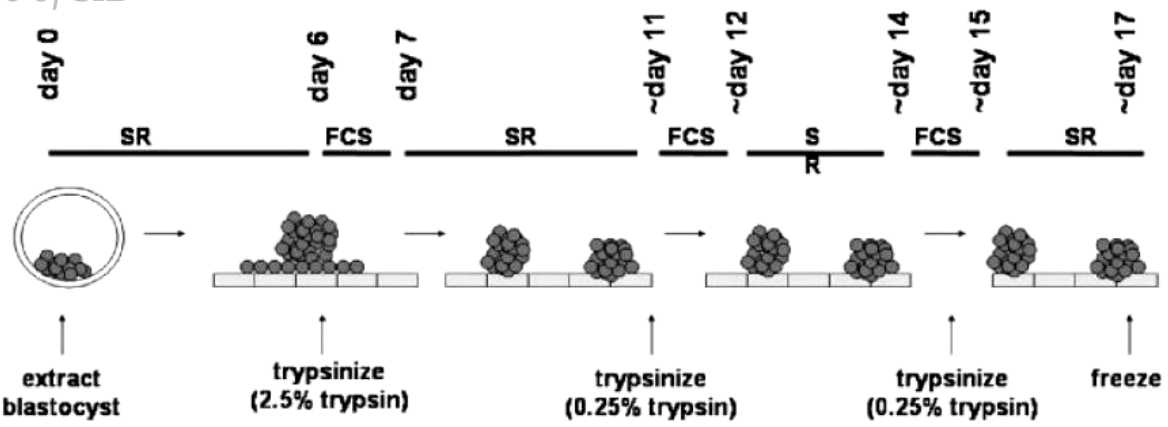
۲- نکتهٔ مهم دیگر این روش، استفاده از MEF هایی است که حداکثر یک روز بیشتراز زمان مایتومایسینه کردن آنها نگذشته باشد، چرا که MEF هایی که زمان بیشتری ازمایتومایسین کردن آنها می گذرد، ماتریکس برون سلولی ضخیم تری تولید می کنند که بعداً در پراکنده کردن سلولهای ICM مشکل ساز می شود.

۳- نکته دیگر، استفاده از غلظت بالاتر تریپسین (۲/۵ درصد) در مرحله پراکنده کردن سلولهای ICMاست.

1 Passage 1; P1

www.SID.ir

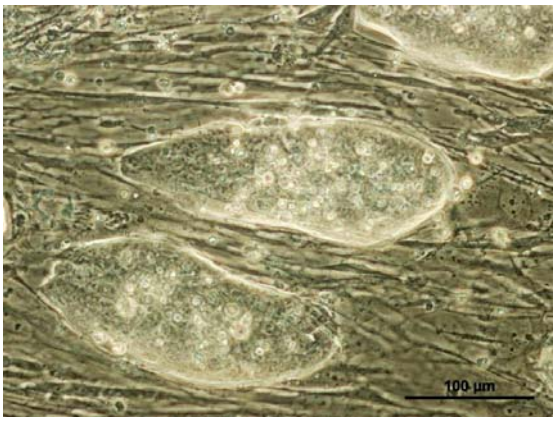
Archive of SID



شکل ٦. مراحل تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی

کاشت (کشت)، داشت (نگهداری) و برداشت (پاساژ و انجماد) سلولهای بنیادی‌جنینی موشی

به منظور حفظ شرایط پرتوانی سلولهای بنیادی جنینی لازم است که آنها را در شرایط مطلوب کشت و نگهداری کرد. بنابراین توصیه می‌شود که به دقت مواظب سلولهای بنیادی جنینی بوده و همواره مورفولوژی آنها را تحت یک میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس بررسی کرد. همچنین لازم است که از یک محیط کشت مطلوب برای‌کشت آنها استفاده نمود و هر دو یا حداکثر سه روز (بسته به سرعت رشد) آنها را پاساژ داد (نسبت ۱ به ۳). در کل سلولهای‌بنیادی جنینی در زمان sub confluenceآماده پاساژ یا انجماد هستند. در این زمان کلونیها، آنقدر رشد کرده‌اند که در مجاورت هم قرار می‌گیرند (شکل۷). با نسبت ۱ به ۳، ظرف ٤٨ ساعت، کلونیها به حالت فوق می‌رسند. اگر در شکل کلونیها تغییر ناگهانی به وجود آمد و کناره کلونیها از حالت صاف به کاملا مضرس‌تبدیل و حالت تمایز در آنها مشاهده شد، از آنها استفاده نکنید. در زیر به بیان نحوه انجماد، ذوب و پاساژ سلولهای بنیادی جنینی (ESC) می‌پردازیم.



شکل ۷. کلونیهای سلولهای بنیادی جنینی موشی رویان B1. به حالت دوکی شکل و سه بعدی کلونیها توجه کنید

نگهداری سلولهای بنیادی جنینی

سلولهای بنیادی جنینی در محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موشی (جدول ۲) کشت و نگهداری می‌شوند. ترکیبات این محیط در ادامه آورده شده است. بسته به اندازه ظرف کشت، حجم محیط افزودنی تغییر می‌کند کیفیت سرم افزودنی به این محیط بسیار مهم است؛ به طوری که بر بازدهی گسترش[1] یعنی تعدادکلونیهای حاصل از سلولهای بنیادی جنینی اثر

1- Plating Efficeincy

www.SID.ir

Archive of SID

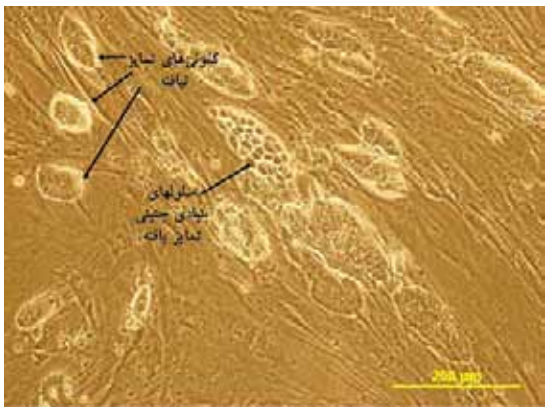
می‌گذارد.

هر روز باید محیط کشت روی سلولهای بنیادی جنینی را تعویض نمود و هر دو روز یا حداکثر سه روز باید آنها راپاساژ داد کیفیت محیط کشت آنقدر مهم است که در صورت نبود کیفیت مناسب، سلولهای بنیادی جنینی تمایز می‌یابند (شکل ۸).

جدول ۲. ترکیبات محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موشی

نام ماده	شرکت	شماره کاتالوگ	حجم(ml)
Knockout DMEM	Gibco	10829-018	۵۰۰
پنی سیلین ـ استرپتومایسین	Gibco	15140-148	۵
اسیدهای آمینه غیرضروری	Gibco	11140-035	۵
بتامرکاپتواتانل (1:1000)	Sigma	M7522	۰/۵
سرم جنین گاوی مخصوص کشت[1]	Gibco	161141-079	۷۵

محلول فوق در لوله‌های ۵۰ ml تقسیم‌بندی می‌شود و به هنگام استفاده ال ـ گلوتامین وLIF یا ESGRO به هر لوله اضافه می‌شود



شکل ۸ کلونیهای سلولهای بنیادی جنینی تمایز یافته و کلونیهای تمایز نیافته

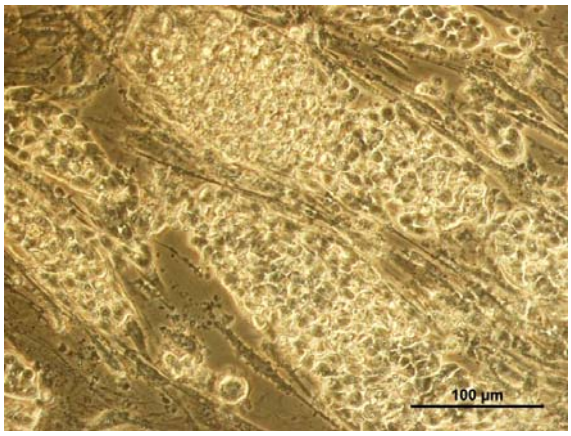
پاساژ سلولهای بنیادی جنینی موشی

برای تکثیر سلولهای بنیادی جنینی و نیز جلوگیری از تمایز آنها لازم است که آنها را پاساژ داد , زیرا هرگاه اندازه‌کلونیها بزرگ شود، تمایز می‌یابند. واژه پاساژ شامل موارد زیر می‌شود:

۱) محیط روی سلولها را بردارید.

۲) دوبار سلولها را با PBS عاری از Ca^{2+} و Mg^{2+} بشویید (برای فلاسک کوچک ۵ ml و فلاسک بزرگ ۱۰ ml).

۳) PBS را بردارید و ۲ ml محلول PBS-EGTA به فلاسک کوچک اضافه کنید (۲دقیقه)EGTA. سبب حذف Ca^{2+} بین سلولها می‌شود و به دنبال آن بین سلولها فاصله‌ای مشخص می‌شود (شکل ۹).



شکل ۹. افزودن EGTA سبب جذب یون کلسیم و مشخص شدن سلولهای بنیادی جنینی در هر کلونی می‌شود

٤) به‌آرامی هر چه تمام محلول PBS-EGTA را بردارید.

۵) ml ۱ محلولTrypsin/EDTA اضافه کنید و۳ دقیقه زمان بگیرید. نزدیک به انتهای زمان تیمار، دو یا سه بار به فلاسک ضربه بزنید تا همه سلولها کنده شوند. در انتهای زمان باقیمانده، می‌توان سلولها را پیپت کرد تاسوسپانسیون

www.SID.ir

Archive of SID

تک‌سلولی از آنها به دست آید.

٦) ۵ml محیط ES-DMEM اضافه کنید و محتویات سلولی را پس از پیپت‌کردن به سه عدد فلاسک‌کوچک حاوی MEF تیمار شده با مایتومایسین منتقل کنید (هر فلاسک۲ ml). محیط این فلاسکها را از قبل(ترجیحاً ٤ـ۳ ساعت قبل) با ۵ml محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موشی تعویض کنید.

انجماد سلولهای بنیادی جنینی موشی

سلولهای بنیادی جنینی همراه با MEF منجمد می‌شوند به طوری که فلاسک کوچک۲cm ۲۵ در سه ویال منجمد می‌شود. حداقل یک ساعت قبل از انجماد سلولها، محیط کشت آنها را با محیط کشت تازه تعویض کنید و سپس اقدام به انجماد کنید. مراحل انجماد یک فلاسک کوچک cm^2 ۲۵ عبارتند از:

پنج مرحله اول مربوط به پاساژ سلولهای بنیادی موشی را انجام دهید.

٦) سوسپانسیون را به یک لوله منتقل کنید و۲ ml دیگر محیط کشت ES-DMEMبه فلاسک اضافه کنید و پس از شستشو، محتویات آن را به لوله اضافه نمایید.

۷) سلولها را به مدت ۸ دقیقه و با دور۸۰۰ rpm سانتریفوژ کنید.

۸) سه ویال انجمادی(Nunc, ۲ml) به ازای هر فلاسک کوچک تهیه نمایید و با ماژیک مخصوص روی آن مشخصات سلولهای بنیادی جنینی شامل نام رده سلول بنیادی جنینی ، در صورت نیاز نژاد موش، پاساژ و تاریخ انجماد را بنویسید.

۹) محیط روی سلولها را بردارید.

۱۰) با زدن چند ضربه آرام، پلاک سلولی را به هم بزنید.

۱۱) ml ۳ محلول انجماد به لوله اضافه کنید و سلولها را پیپت کنید. نوع مواد و غلظت ترکیبات محلول‌انجماد سلولهای بنیادی جنینی شبیه MEF است که قبلا بیان شده است و باید محلول سرد باشد. تنها تفاوت آن‌است که به جای محیط کشت سلولهای تغذیه کننده از محیط کشت ES-DMEM که حاوی LIF (1000IU/ml) است، استفاده می شود.

۱۲) ml۱ از سوسپانسیون فوق را به هر ویال انجمادی اضافه کنید.

۱۳) ویالها را به ظرف انجماد[1] که از قبل در یخچال (٤ درجه سانتی گراد) نگهداری می‌شود، منتقل کنید و سپس ظرف مزبور را بلافاصله به فریزر (۷۰ – درجه سانتی گراد) منتقل کنید.

١٤) روز بعد ویالهای انجمادی را به تانک نیتروژن منتقل نمایید.

۱۵) آدرس سلولها شامل شماره تانک، شماره holder و شماره rack و مشخصات سلولها شامل نام رده‌بنیادی جنینی، در صورت نیاز نژاد موش، تعداد پاساژ، تاریخ انجماد، نام فرد منجمد کننده و تغییرات انجام شده بر رده بنیادی جنینی رادر دفتر مربوط به آن ثبت کنید.

ذوب سلولهای بنیادی جنینی موشی

به طور کلی انجماد سلولهای بنیادی جنینی به کندی و ذوب آنها به سرعت انجام می‌شود. برای ذوب سلولهای بنیادی جنینی موشی کشت شده در یک فلاسک کوچک (cm^2 ۲۵) مراحل زیر را انجام دهید:

۱) محیط کشت فلاسک را که از قبل با مایتومایسین C تیمار شده است برداشته و به جای آن۷ ml محیط کشت ES-DMEMاضافه کنید.

۲) آدرس سلولهای بنیادی جنینی و مشخصات آنها را از دفتر مخصوص انجماد ملاحظه کنید و مشخصات سلولی را روی فلاسک بنویسید.

1- Cryocooler

www.SID.ir

Archive of SID

۳) با استفاده از یک فورسپس که قفل می‌شود، ویال را گرفته و از تانک خارج نمایید و بلافاصله آن را به‌آب ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل نمایید. دقت نمایید که داخل ویال آب نرود.

٤) هنگامی که بخش عمده محتویات ویال ذوب شد و مقدار کمی به صورت منجمد باقی ماند، سطح ویال را با اتانول ۷۰ درصد بشویید و در ویال را زیر هود باز کنید.

۵) محتویات ویال را به فلاسک کوچکی که از قبل تدارک دیده بودید منتقل کنید.

٦) فلاسک را به انکوباتور مرطوب، ۵ درصد CO2 و ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل نمایید.

۷) روز بعد، محیط سلولها را تعویض نمایید.

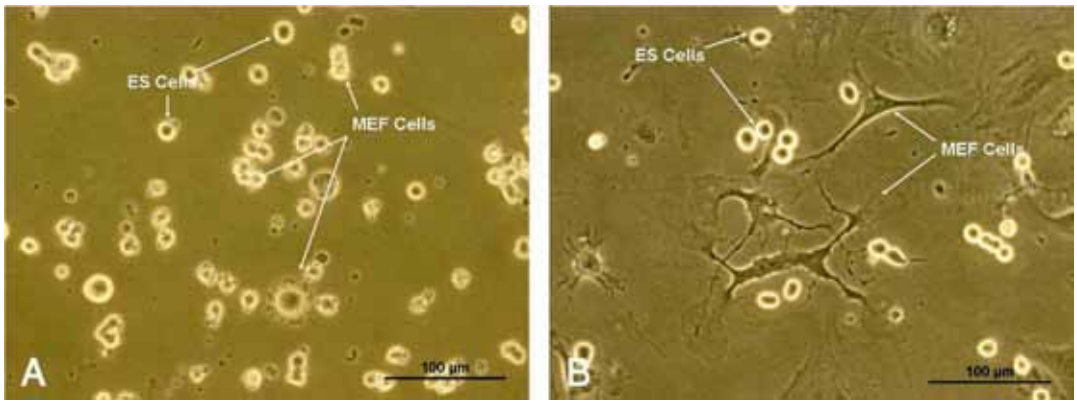
جداسازی سلولهای بنیادی جنینی از سلولهای تغذیه کننده

به منظور انجام تمایز سلولهای بنیادی جنینی لازم است تا در ابتدا سلولهای بنیادی جنینی را از فیبروبلاستهای جنین موش (MEF) جدا کرد. برای این‌منظور، مراحل‌زیر را به ترتیب انجام دهید:

۱) مرحله ۵ ـ۱ دستورالعمل پاساژ سلولهای بنیادی جنینی را انجام دهید.

۲) در انتهاml ۵ محیط کشت ES-DMEM به فلاسک کوچک اضافه کنید و محتویات سلولی را به‌خوبی پیپت نمایید. تا سوسپانسیون تک سلولی به دست آید. این موضوع بسیار مهم است، در غیر این صورت، در مراحل بعدی تعداد زیادی از سلولهای ES هدر می‌رود. یک سوم فلاسک کوچک را به یک پتری بزرگ (۱۰ cm) مخصوص کشت سلول منتقل کنید وml ۸ محیط کشت ES-DMEM به آن اضافه نمایید و سوسپانسیون را به هم بزنید تا توزیع سلولها یکنواخت باشد. زیرمیکروسکوپ معکوس فاز کنتراست سلولهای MEF بیشتر از سلولهای بنیادی جنینی و با کناره مضرس و تیره هستند درحالی که کناره سلولهای بنیادی جنینی صاف و براق است.

۳) پتری را به انکوباتور منتقل کنید و برای۱/۵ ساعت آن را بدون هرگونه‌حرکتی انکوبه کنید. طی این مدت سلولهای MEF به کف ظرف متصل می‌شوند و پهن می‌گردند، درحالی که سلولهای بنیادی جنینی به حالت سوسپانسیون باقی می‌مانند. سلولهای MEF بعد از ۵ دقیقه شروع به‌چسبیدن می‌کنند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. جداسازی سلولهای بنیادی جنینی ازMEF. A) قبل از جداسازی توجه کنید که سلولهای بنیادی جنینی به صورت گرد و شناورند ولی سلولهای MEF به کف ظرف چسبیده و پهن شده‌اند. B) بعد از جداسازی

٤) پتری را زیر میکروسکوپ فاز کنتراست نگاه کنید. به تفاوت سلولها دقت نمایید. سوسپانسیون سلولی رویی را با

www.SID.ir

Archive of SID

پیپت بردارید و به لوله‌ای منتقل کنید.

۵) چند ضربه با انگشت اشاره به کناره پلیت بزنید و سطح پتری را با ۵ml محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موشی بشویید و محتویات را به همان لوله منتقل نمایید.

٦) لوله را با سرعت rpm ۸۰۰ به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ کنید.

۷) محیط رویی را حذف کنید.

۸) با چند ضربه آرام به لوله، رسوب سلولی را به هم بزنید.

۹) به مقدار لازم به سلولها، محیط کشت مورد نظرتان را اضافه کنید.

پاساژ سلولهای بنیادی جنینی انسانی[1]

بسیاری از رده‌های hESC تولید شده با کلاژناز یا Dispase به همراه پراکنده کردن مکانیکی پاساژ داده می‌شوند.

در پاساژ مکانیکی به جهت اینکه ما می‌توانیم قسمتهای تمایز نیافته را از قسمتهای تمایز یافته جدا کنیم و کشت دهیم در کشتهای بعدی حاصل از این نوع پاساژ کلونی های بهتری خواهیم داشت ولی باید به این نکته توجه داشت که این روش بسیار زمان بر است و ما نمی‌توانیم با این روش سلولهای زیادی کشت دهیم. پس در واقع ما در پاساژهای اولیه که قسمت های تمایز یافته کشتهایمان بیشتر دیده می شود از روش مکانیکی استفاده می کنیم و وقتی که کشت ما، سلولهای تمایز یافته کمتری داشت ما از روش آنزیمی برای پاساژ استفاده می کنیم. کلونیها معمولاً در روز هفتم یعنی وقتی که قطر آنها به حدود ۲ -۱/۵ میلیمتر رسید پاساژ داده می شوند، البته اگر کلونیها خوب باشند پاساژ در روز ششم هم ممکن است و برعکس اگر کوچک باشند روز هشتم پاساژ داده می‌شوند.

قبل از انتقال کلونیها باید بهترین ظرفهای کشت را برای این کار انتخاب شود. همچنین باید بهترین قسمت مربوط به هر کلونی را برداشت. کلونیهای مربوط به هر ظرف پس از برش معمولاً به ۲ الی ٤ ظرف هم سطح منتقل می‌شوند.

جدول ۳ ترکیبات محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی انسانی را نشان می‌دهد.

جدول ۳. ترکیبات محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی انسانی

نام ماده	شرکت	شماره کاتالوگ	حجم(ml)
Knockout DMEM	Gibco	10829-018	۴۰۰
پنی سیلین ـ استرپتومایسین	Gibco	15140-148	۵
اسیدهای آمینه غیرضروری	Gibco	11140-035	۵
(1:1000) 0.1M بتامرکاپتواتانل	Sigma	M7522	۰/۵
سرم جنین گاوی مخصوص کشت	Gibco	161141-079	۱۰۰
ITS	Gibco	41400-045	۵

محلول فوق در لوله‌های ml ۵۰ تقسیم‌بندی کنید و به هنگام استفاده ۵۰۰ml ال ـ گلوتامین به هرلوله اضافه نمایید.

رتبه بندی کلونیهای hESC

جدول ٤ و شکل ۱۱، رتبه بندی کلونیها را نشان می دهد.

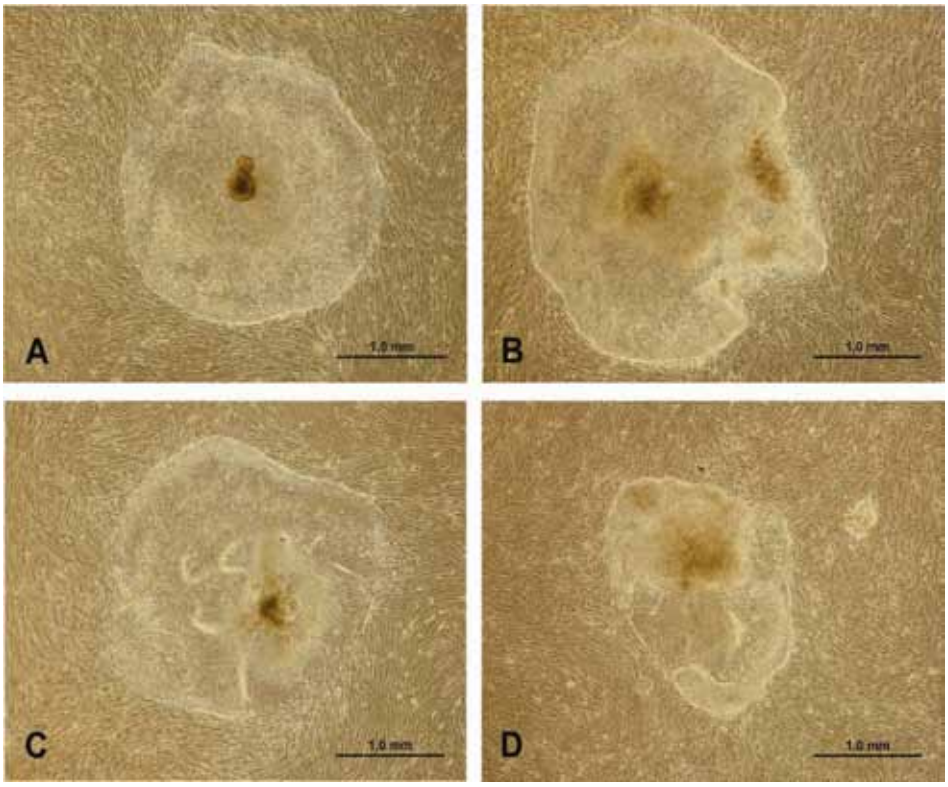
1- Human Embryonic Stem Cells; hESCs

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤. رتبه بندی کلونیهای hESC

رتبه	توصیف
A عالی	کلونیهایی با سطح در ظاهر هموار و لبه های مشخص ، باید توجه داشت که کلونیها لزوماً نباید دایره ای شکل باشند ، بلکه لبه های مشخص و سلولهای هم شکل قابل قبول است. کلونیها متراکم ،ضخیم و چند لایه (مانند) که بیشتر خاکستری یا شفاف به نظرمی رسند. شما نباید به راحتی قادر به تشخیص سلولها به طور جداگانه باشید. کلونی شامل درصد ۳۰ – ۰ تمایز یافتگی می توان از ۷۰ تا ۱۰۰ درصد کلونی برای انتقال استفاده کرد.
B خوب	کلونی با ۳۰ تا ٦۰ درصد تمایز یافتگی شما می توانید از ٤۰ تا ۷۰ درصد از کلونی برای انتقال استفاده کنید
C متوسط	کلونی با حدود ٦۰ تا ۷۰ درصد تمایز یافتگی، معمولاً از این کلونیها برای انتقال استفاده نمی کنند اما اگر نیاز بود کمتر از ٤۰ درصد از این کلونیها قابل استفاده است.
D بد	کلونیهایی که خوب رشد نکرده اند و سلولهای تمایز یافته زیادی دارند این کلونیها اغلب سطح ناهموار با مورفولوژی رشته‌ای، حبابی شکل یا حالت «تپه – دره» در آنها دیده می شود. این کلونیها کاملاً بی استفاده‌اند.



شکل ۱۱. رتبه بندی کلونیهای hESC. A) رتبه عالی. B) رتبه خوب. C) رتبه متوسط. D) رتبه بد

www.SID.ir

Archive of SID

درست کردن پیپت برای برش کلونیهای hESC

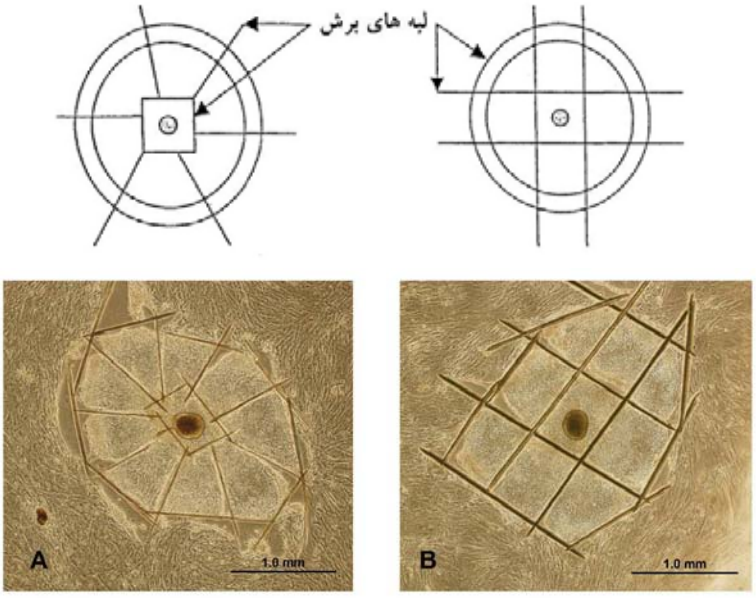
قطر پیپت پاستور ۱ میلیمتر است که باید با کشیدن آن روی شعله این اندازه را به حدود ۰/۲۵ میلیمتر برسانید تا قادر باشید با ظرافت کلونیها را برش بزنید. باید توجه داشت که اگر نوک پیپت خیلی دراز و نازک باشد هنگام برش کلونی می شکند وهمچنین نوک خیلی ضخیم باعث پاره شدن کلونی و عدم تسلط ما به برش می شود. نوک پیپت باید طوری شکسته شود که یک لبه نسبتاً کوتاه، بدون دندانه و تیز ایجاد کند (مراحل ساخت در شکل ۱۳ نشان داده شده است.)

برش کلونیهای hESC

بر اساس علاقه شخصی به دو روش می توان کلونیهای hESC را برش زد که در شکل ۱۲ نشان داده شده است.

برش زدن کلونی با اندازه‌های یکسان در زمان برش بسیار مهم است، چراکه اگر قطعات کوچک باشند زمان بیشتری نیاز است که به اندازه ای رشد کنند که قابل پاساژ شود و همچنین اگر قطعات بزرگ باشند درانتقال آنها با پیپت به مشکل بر می‌خورید. باید توجه داشت که سلولهای تغذیه کننده (MEF)، تاحد امکان از قطعات کلونی باید جدا شوند.

شکل ۱۲. مراحل درست کردن پیپت برای برش کلونیهای hESC



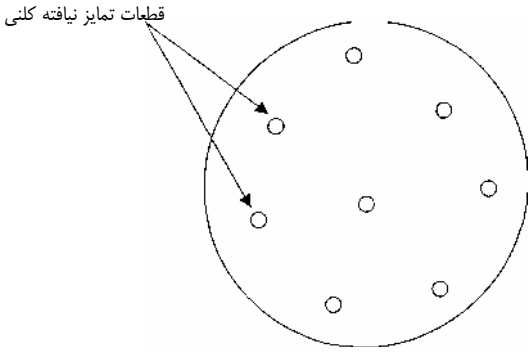
شبکه مانند چرخ مانند

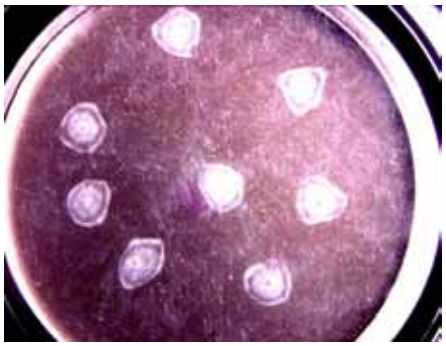
شکل۱۳. برش زدن کلونیهای hESC

www.SID.ir

Archive of SID

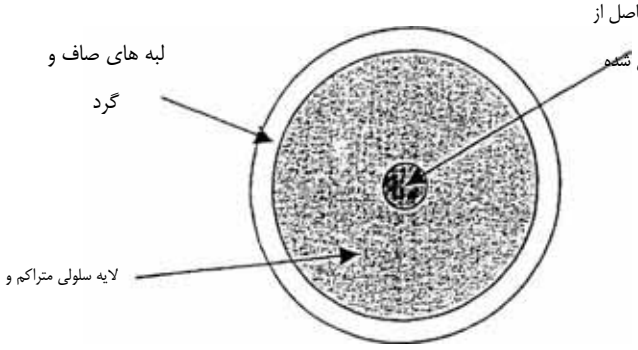
نمای شماتیک کلونی های hESC کشت شده در پلیت

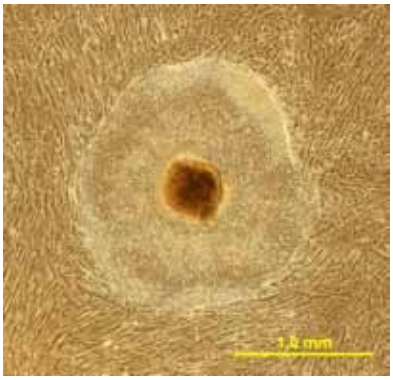




عکس استریومیکروسکوپ از کلونی های سلولهای بنیادی جنینی انسانی (۷ روز پس از کشت) که روی سلولهای تغذیه کننده رشد کرده‌اند

شکل ١٤. نمای شماتیک و عکس استریومیکروسکوپ از کلونی های سلولهای بنیادی جنینی انسانی





شکل ١٥. نمای شماتیک و عکس میکروسکوپ معکوس از یک کلونی سلولهای بنیادی جنینی انسانی

شکل ظاهری کلونیها بعد از انتقال

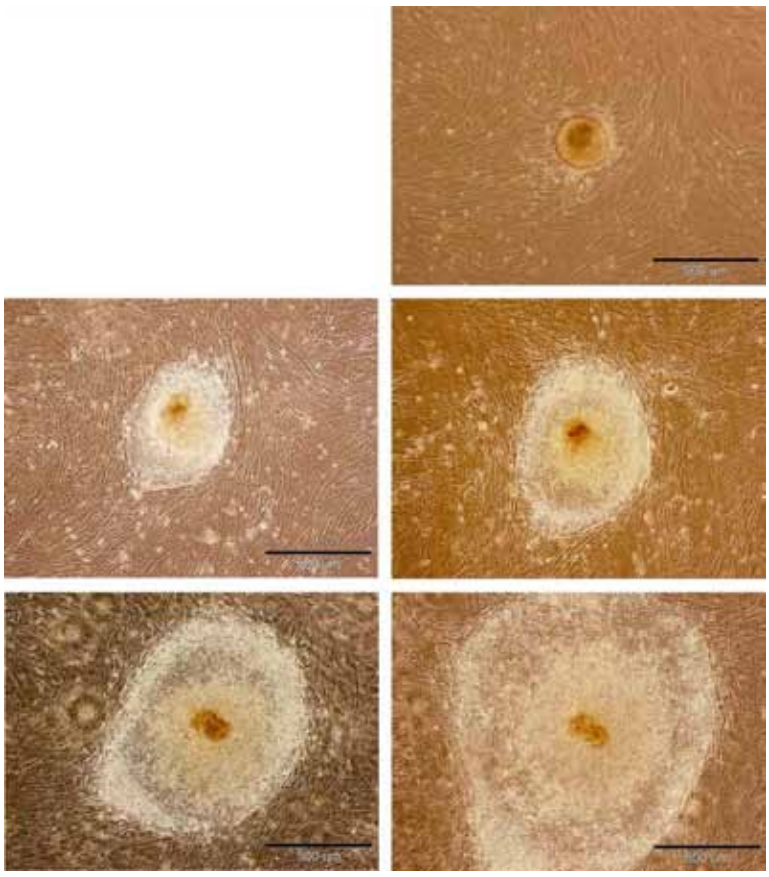
در جدول٦، مشخصات کلونیهای hESC بعد از انتقـال، از روز اول تا روز انتقال بعدی آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول٦. مشخصات کلونیهای hESC بعد از انتقال

روز	توصیف
۰	روز اول انتقال (پاساژ)
۱	به طور معمول قطعات به شکل گرد شبیه به «دکمه» با لبه های مشخص و کاملا" متراکم دیده می شوند.
۲	سلولها از قسمت وسط دکمه شروع به گسترده شدن (رشد) می کنند.
۳	سلولها به گسترده شدن از مرکز این دکمه ادامه می‌دهند که تا حدودی مشخص است. کلونی ها دراین روز خیلی تیپیک نیستند و ممکن است سالم به نظر نرسند.
٤	بعضی کلونی‌ها همچنان به حالت توصیف شده درروز قبل هستند ، در صورتی که کلونی ها ی دیگر مورفولوژی یک کلونی مشخص (تیپیک) رانشان می دهند ، اگر چه همچنان کوچک می باشند.
۵	کلونی‌ها مورفولوژی طبیعی خودشان را که شامل کناره های مشخص و مرکز متراکم تر حاصل از قطعه اولیه کلونی است نشان می دهد. معمولا" سلولهایی که درناحیه بین قسمت لبه ها و قسمت مرکزی هستند نازک به نظر می‌رسند. کلونی‌ها دراین روز تاحدودی کوچک هستند.
٦	کلونی بسته به رده سلولی آماده انتقال است. باید توجه داشت که کلونی ها ممکن است هنوز کوچک باشند وتراکم کمتری نسبت به کلونی در روز هفتم داشته باشند.
۷	روز اول انتقال (پاساژ)



شکل۱۵. ظاهر کلونیها بعد از انتقال

www.SID.ir

انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی

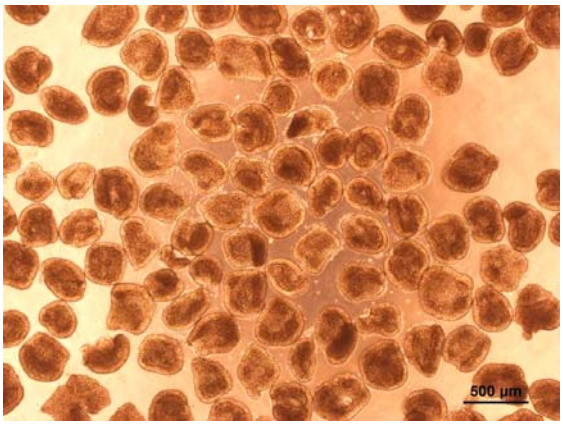
انجمـاد سـلولهای بنیـادی جنینـی انـسانی بـه دو روش انجـام می‌شود: انجماد شیشه‌ی[1] وانجماد ویالی[2]

الف) روش انجماد شیشه‌ای

از این روش برای انجماد سلولهایی که روی MEF کشت شده انـد استفاده می‌شود. برای انجام این روش به صورت زیر اقدام کنید:

محلولهـای ذوب و انجمـاد را طبـق مقـادیری کـه در بخـشهای مربوطه آورده شده اند آماده کنید ، نکات مربوط بـه ترکیبـات و استفاده از آنها در متن آورده شده است.

ابتدا باید کلونیها را به قطعاتی که اندکی بزرگتر از برشهای مربـوط به پاساژ هستند، برش دهید و سپس توسط سمپلر ایـن قطعـات را کنده و در چاهک شماره۱ پلیت چهار خانه قرار دهید (شکل ۱۷).



شکل ۱۷. قطعات حاصل از برش کلونیهای سلولهای بنیادی جنینی انسانی

یـک ویـال مخـصوص انجمـاد[3] ۵ میلـی لیتـری برداریـد، مشخصات رده سلولی را که قراراست منجمـد شـود روی آن بنویسید و به وسیله یک سر سوزن G ۱۸ کـه روی شـعله داغ کرده اید چهار سـوراخ در قـسمت بـالا و چهـار سـوراخ در قسمت پایین ویال ایجاد کنید تا نیتروژن به راحتی وارد فضای داخلی شود. سپس در این ویال را نیمه باز کنید و در یک رک مخصوص آلومینیومی[4] قرار داده و آن را داخل یک ظـرف در باز حاوی نیتروژن مایع بگذارید. (درمراحل بعدی اهمیت این کار معلوم می شود)

1- Vitrification
2- Cryopreservation
3- Cryovial

انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی بـه روش انجماد شیشه‌ای

hESC/ HEPES

۱) HEPES 1M ۲۵۰µl

۲) hESC ۱۰ml

۳) Combine, store ٤ ºC

1M Sucrose media:

این محلول ترکیبی از محلول انجماد شیشه‌ای است.

۱) Sucrose ۱/۷۱ gr

۲) hESC/HEPES ٤ ml

۳) Warm ۳۷ ºC

٤) Up to 5ml with hESC/HEPES

۵) Filter

٦) Store at 4ºC , 1 week

محلول انجماد شیشه‌ای ۱۰٪

۱) hESC/HEPES ۲ml

۲) Ethylene Glycol ۰/۲۵ ml

۳) DMSO ۰/۲۵ml

٤) Combine, store at 4ºC, 1 day

محلول انجماد شیشه‌ای ۲۰٪

۱) hESC/ HEPES ۷۵۰µl

۲) Sucrose ۷۵۰µl

۳) Ethylene Glycol ۵۰۰µl

٤) DMSO ۵۰۰µl

۵) Combine, store at 4ºC, 1 day

4- Cryocane

Archive of SID

www.SID.ir

۱)	۲) محیط hESC/HEPES
۳) ٪۱۰ VS ۱′	٤) ٪۲۰ VS ۲۵″

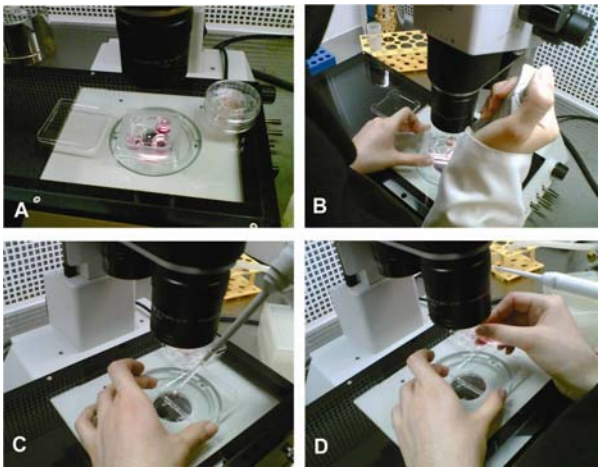
ظرف چهارخانه

۱ – محیط انسانی حاوی HEPES ، ۱ مولار (HEPES در اینجا در پایدار ماندن PH در محیط کمک می کند). ۱ میلی لیتر از این محیط را در چاهک شماره ۲ یک ظرف چهارخانه بریزید و سلولهای چاهک شماره ۱ را به آن منتقل کنید (شکل۱۸–A).

۲– محیط انجماد ۱۰ درصد: (۱ میلی لیتر از آن را داخل چاهک شماره ۳ بریزید) سمپلر را در کمترین مقدار ممکن که می توانید به راحتی ۸ تا ۱۰ کلونی به آن منتقل کنید تنظیم کرده (حدود ۱۰ µl) وبا دقت این تعداد کلونی را از چاهک ۲ به چاهک ۳ منتقل کنید و یک دقیقه زمان بگیرید. باید دقت داشت که در حین کار حباب ایجاد نشود ودر ضمن درهر انتقال سرسمپلر عوض شود. قطعات منتقل شده به این محیط به علت ویسکوزیته بالا به حالت چرخان در می آیند و پخش می شوند که باید توسط ضربات نوک سر سمپلر به قطعات آنها را در محیط غوطه ور کرده و در کف ظرف جمع کنید.

۳– محیط انجماد ۲۰ درصد: (۱ میلی لیتر داخل چاهک شماره ٤ بریزید) قطعات داخل چاهک قبلی را با همان دقت به این محیط منتقل کنید و ۲۵ ثانیه زمان بگیرید (شکل۱۷– B). دراینجا نیز به علت ویسکوزیته بالا همان مشکل پخش شدن و در سطح قرار گرفتن کلونی ها را دارید که باید دقت داشت و همانطور که گفته شد قطعات را غوطه ور ساخت. در مرحله بعد این قطعات را با کمترین حجم محیط روی در ظرف قرار دهید و با یک نی مخصوص انجماد (که از قبل روی هیتر با دمای ۱۵۰ċ کشیده‌اید وقطر آن را نازک تر کرده‌اید) قطعات را جمع کنید (شکل ۱۷– Cو D). توجه داشته باشید که باید نی انجماد را در زاویه ۳۰ درجه با قطعات تماس دهید تا طبق خاصیت موئینگی این قطعات به داخل نی کشیده شوند، همچنین سرعت عمل بالا در انجام این مراحل بسیار ضروری و مهم است. این نی حاوی قطعات سلولی را با زاویه ٤۵ درجه وارد نیتروژن مایع کنید وبعد آنها را در ویال انجماد که از قبل آماده کرده‌اید نگهداری کنید. شکل ۱۷ بخشی از کار را نشان می دهند.

Archive of SID



شکل ۱۸. مراحل انجام فریز سلولهای بنیادی جنینی انسان به روش انجماد شیشه‌ای (Vitrification)

ذوب سلولهای انسانی به روش انجماد شیشه‌ای

0.2M sucrose

۱) hESC/HEPES ۲ ml

۲) Sucrose 1M ۰/ ۵ ml

۳) Combine, store at 4ºC, 1 day

0.1M sucrose

۱) hESC/HEPES ۲/۲۵ ml

۲) Sucrose 1M ۰/۲۵ ml

۳) Combine, store at 4ºC, 1 day

۱) ۰/۲M ۱′	۲) ۰/۱M ۵′
۳) hESC/HEPES Medium, ۵′	٤) hESC/HEPES Medium ۵′

ظرف چهارخانه

hESC/HEPES
Sucrose 1M

www.SID.ir

محلول ذوب

پس از آماده کردن محلولها به صورت زیرعمل کنید.

ابتدا ویال فریز حاوی نی‌ها را در آورده در آن را نیمه باز کرده و سپس در داخل ظرفی که نیتروژن مایع در آن ریخته اید قرار دهید. سپس با یک پنس نوک باریک[1] یکی از نی‌ها را برداشته و با کمک انگشت شصت وانگشت وسط نی را با سرعت از نیتروژن خارج کرده و به داخل چاهک اولی که ۲۰TS درصد است ببرید و در حین تماس با محیط انگشت اشاره را با فشار در ته نی فریز قرار دهید تا فشار حاصل از بخار نیتروژن باعث خروج قطعات سلولی فریز شده به داخل TS درصد۲۰ شود. یک دقیقه زمان بگیرید (شکل۱۹– B).

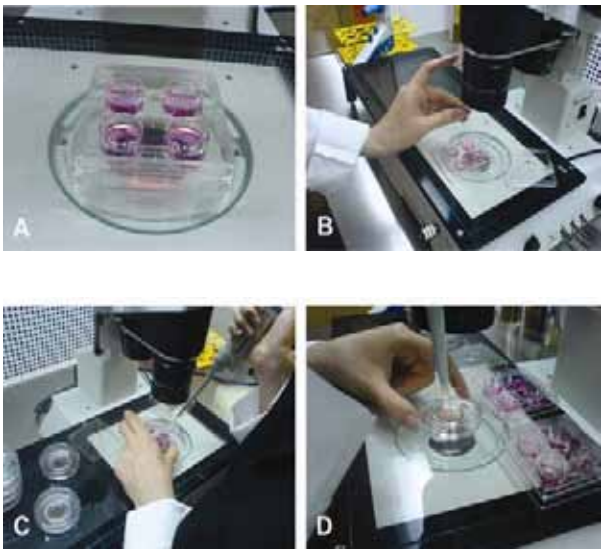
نکته : باید توجه داشت که حتماً از عینک ایمنی دراین کار استفاده شود چراکه نیتروژن برای چشم خطرناک است و در ضمن در حین انتقال نی، ته نی به سمت صورت شما یا همکارانتان نباشد چرا که نیتروژن از آن به بیرون می پرد.

قطعات را بعد از ۱ دقیقه زمان جمع کرده به داخل محیط دوم که حاوی M ۰/۱ سوکروز است ببرید و ۵ دقیقه زمان بگیرید (شکل۱۹– C).

این قطعات را در داخل چاهک های شماره ۳ و٤ هر کدام به مدت ۵ دقیقه ، منتقل کنید تا کاملاً از محیط فریز شسته شوند. پس از این مراحل قطعات را داخل ظرفهای پوشیده شده با MEF غیر فعال شده که از قبل آماده کرده اید قرار دهید (شکل۱۹– D).

کشت، پاساژ و انجمادhESC در شرایط عاری از سلولهای تغذیه کننده[2]

در راستای کاربردی کردن سلولهای بنیادی جنینی انسانی، گروههای تحقیقاتی مختلفی درسراسر دنیا در حال کشت این سلولها درشرایط عاری از هر گونه مشتقات حیوانی[3] هستند که تاکنون به موفقیت هایی در این زمینه دست یافته اند [٦].



شکل۱۹. مراحل انجام ذوب سلولهای بنیادی جنینی انسانی که به روش انجماد شیشه‌ای (Vitrification) منجمد شده‌اند.

در این راستا به جای سلولهای تغذیه کننده از یک ماتریکس برون سلولی به نام ماتریژل[4] ، و همچنین به جای سرم جنین گاوی از یک سرم تجاری به نام Knockout serum Replacement استفاده می شود، که تقریباً تمام ترکیباتش به غیر از ترکیبات ناشناخته ای که در فرایند استخراج و خالص سازی آلبومین همراه آن می آیند شناخته شده و سنتزی است. (جدید ترین کاری که در این زمینه انجام شده تولید دو رده سلول بنیادی جنینی به نام های WA15. و WA16 در شرایط کاملاً تعریف شده بود که درآن از لامینین و فیبرونکتین انسانی به جای ماتریژل که از یک سارکومای موشی به دست می آید و منبع حیوانی دارد و همچنین استفاده از آلبومین انسانی در

1- Forceps
2- Feeder Free Culture

3- Xenon Free Culture
4 Matrigel, ECM gel From Engelbreth Holm-Swarm Mouse Sarcoma

Archive of SID
www.SID.ir

ترکیب سرم بوده است).

Archive of SID

استفاده از ماتریژل

ماتریژل با رقت نهایی ۱/۳۰ استفاده می‌شود، برای این کار ظرف اصلی ماتریژل را که در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود، به مدت ٢٤ ساعت در یخچال (٤ درجه سانتی گراد) نگه دارید تا ذوب شود (دقت داشته باشید که ماتریژل در دمای اتاق به ژل تبدیل می‌شود که قابل استفاده ناست)، سپس بامحیط DMEM/F-12 به نسبت ۱/۲ رقیق کنید و به میزان مورد استفاده در ویالها تقسیم‌بندی کنید و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کنید زمان استفاده این ویال را در ٤ درجه سانتی گراد ذوب کنید و ۱۵ برابر دیگر رقیق کنید که همان رقت ۱/۳۰ ذکر شده است. سپس کف ظرفهای خود را با آن بپوشانید و۲ الی ۳ ساعت صبر کنید. بعد از این مدت ماتریژل را بکشید و با +PBS کف ظرف را شستشو دهید و بعد محیط کشت سلول را اضافه کنید.

کشت و پاساژ

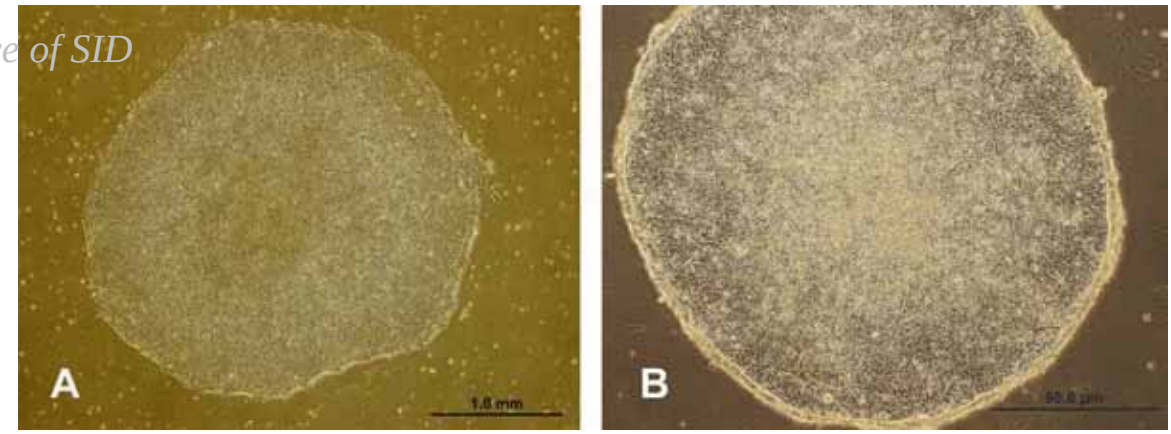
کلونیهای ۷ روز کشت شده را پس از دو بار شستشو با +PBS به وسیله آنزیم کلاژناز نوع IV (به مدت ٦ الی ۸ دقیقه) و به کمک Cell Scraper جمع کنید و به یک لوله سانتریفوژ منتقل کنید. پس از ته نشین شدن قطعات کلونی، محلول رویی که حاوی سلولهای تک شده یا قطعات بسیار ریز است به گونه ای جدا کنید که حدود ۲۰۰µl از آن با قطعات سلولی ته نشین شده باقی بماند. انگشت دستتان به آرامی به این قطعات ضربه بزنید تا اندکی ریزتر شوند(قطعات د رحد ۵۰ تا۱۰۰ سلولی مناسب‌اند). این قطعات را به ظرفهایی که از قبل با ماتریژل کف آنها را پوشانده‌اید منتقل کنید (جدول٦ و شکل۲۰).

جدول ٦. ترکیبات و غلظت مواد محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی انسانی در شرایط عاری از سلولهای تغذیه کننده

نام ماده	غلظت نهایی در محیط کشت	حجم(ml)
۱) DMEM/F-12	۸۰%	۱۵۰
۲) Knockout SR	۲۰%	۴۰
۳) NEAAs	۰/۱ mM	۲
۴) L-glu	۲ mM	۲
۵) B-ME	۰/۱ mM	۲۰۰µl (from 100mM Stock)
۶) Pen/strep	۱۰۰ U/ml penicillin and ۱۰۰µg/ml streptomycin	۲
۷) ITS	۵ mg/ml insulin, ۵ mg/ml transferrin, ۵ µg/ml selenium	۲
۸) noggin	۱۰۰ ng/ml	۴۰۰ µl
۹) bFGF	۴۰ng/ml	۳۲۰ µl

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲۰. یک کلونی از سلولهای بنیادی جنینی انسانی کشت شده در شرایط عاری از سلولهای تغذیه کننده (A) قبل از تیمار با آنزیم کلاژناز نوع IV (B)بعد از تیمار با آنزیم کلاژناز نوع IV

انجماد ویالی

در ابتدا محلول انجماد را آماده کنید:

۱- محیط کشت: ٤٠ درصد، ۲- ko/SR : ٥٠ درصد، ۳- DMSO: ۱۰ درصد

۳/٥-٤ml آنزیم کلاژناز IV روی سلولهای کشت شده (در اینجا ظرف۱۰cm) بریزید و ٦ الی ۸ دقیقه زمان بگیرید. سپس دوبار با +PBS شستشو دهید و با استفاده از یک Cell Scraper کلونیها را از کف ظرف جدا کنید و در یک لوله بریزید. یک دقیقه با دور ۷۰۰rpm سانتریفوژ کنید.

به آرامی به پلاک سلولی باقی مانده ضربه بزنید تا کلونیها تکه تکه شوند.

سپس به آرامی محلول انجماد را به سلولها اضافه کنید. (برای هر ویال ۲۰۰ µl سوسپانسیون) ویال را به فریزر۷۰- درجه سانتی گراد منتقل کنید و بعد از ٢٤ ساعت به تانک نیتروژن منتقل کنید و مشخصات را در دفتر مربوطه یادداشت کنید.

ذوب ویالی

مشخصات سلولی را که می خواهید ذوب کنید از دفتر انجماد مشخص کنید سپس بایک فورسپس ویال را خارج کرده و با حرکت دورانی ویال درون بن ماری محتویات ویال را تا باقی ماندن یک بلور کوچک یخ ذوب کنید(دقت داشته باشید که آب بن ماری به در ویال نرسد). جدار ویال را با الکل ۷۰ درصد بشویید و محتویات آن را زیر هود به ٤ml محیط کشت (بدون فاکتور های رشد) اضافه کنید و ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید بعد قطعات ته نشین شده را به ظرف کشت ماتریژله منتقل کنید.

۷- بررسی برخی مشخصات سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی.

در جدول ۷ بعضی از مشخصات سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

روشهای ارزیابی پایداری وپرتوانی سلولهای بنیادی جنینی

بعد از تولید اولین رده سلولهای hES در سال ۱۹۹۸ ،تا کنون تعداد زیادی (حدود ٤١٤) رده از بلاستوسیستهای انسانی تولید شده است. روشهای تولید ونگهداری این سلولها در آزمایشگاهها متفاوت است [۷].

اما با وجود یکسان بودن مورفولوژی سلولهای بنیادی جنینی، اختلافات مهمی در بین آنها دیده می شود، که عبارتند از: تفاوت در رشد و تمایز، اختلاف در الگوی متیلاسیون، پایداری کاریوتایپ، اختلافات اللی و تغییرات مرتبط با تکثیر طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی. این اختلافات ممکن است منوط به

www.SID.ir

تنوع ژنتیکی ذاتی نمونه انسانی باشد و از طرفی دیده شده که یک رده تحت شرایط مختلف کشت ویا در آزمایشگاههای متفاوت رفتار گوناگونی نشان می دهد. این اختلافات زمانی که سلولهای پرتوان به تمایز القاء می شوند افزایش می یابد زیرا جمعیت اولیه و روش مورد استفاده در تمایز، عمیقاً بر خصوصیت جمعیت تمایز یافته تأثیر می گذارد. در جدول ۸ عوامل احتمالی که منجر به بروز تفاوتهای معنی دار بین رده های سلولی hES می شود خلاصه شده است.

Archive of SID

جدول ۸ . منابع تنوع در میان سلولهای بنیادی جنینی انسانی

تفاوت به علت	تنوع ژنتیکی
منشاء رده سلول	مرحله ای ازبلاستوسیست که رده از آن مشتق می شود
	شرایط کشت اولیه (لایه مغذی، شرایط کشت)
	نشانه‌گذاری وغیر فعال شدن کروموزوم X
تفاوت به علت کشتهای طولانی مدت	تغییرات ژنتیکی (از دست دادن یا بدست آوردن توالی ویژه) تغییرات عمومی وتخصصی اپی ژنتیکی (متیلاسیون DNA واستیلاسیون هیستون)
تفاوت به علت موزاییسم	تمایز کلی و جزئی در جمعیتهای کوچک کشت
	تنوع در میان تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی

جدول ۷ . مقایسه بعضی از مشخصات سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی [۵]

مارکر	سلولهای بنیادی جنینی موش	سلولهای بنیادی جنینی انسانی
SSEA-1	+	–
SSEA-3/-4	–	+
TRA-1-60/81	–	+
TRA-2-54	–	+
GCTM-2	–	+
TG 343		+
TG 30		+
CD 9	+	+
CD133/promrmri	+	+
آلکالین فسفاتاز	+	+
Oct-4	+	+
Nanog	+	+
Sox-2	+	+
FGF4	+	+
گیرندهLIF	+	–/+
فعالیت تلومرازی	+	+
تنظیم خودنوزایی	از طریق رسپتورهای gp 130 لایه تغذیه کننده MEF Nanog،BMP-4	سلولهای تغذیه کننده (MEF یا سلولهای انسانی) سرم ، ماتریژل ،bFGF
خصوصیات رشدin vitro	اتصالات محکم ، کلونیهای چند لایه ای و گرد	کلونیهای پهن با اتصالات بین سلولی سست
تشکیلEB	EBهای ساده و کیستی	EBهای کیستی
تشکیلTeratomas درin vivo	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

محققین در رابطه با ایمن و کارآمد بودن سلولهای hES در طب پیوند، نگرانی بسیار زیادی دارند، مطالعه مقایسه ای فراگیر بین رده های hES، راه حل ایده آلی در این زمینه است. اهمییت ارزیابی مقایسه ای رده ها، برای پیدا کردن مناسبترین رده برای درمان، باعث شده تا مراکز تحقیقاتی با ایجاد طرحهای ملی دست به طراحی مجموعه استانداردهایی بزنند که در سطح جهانی قابل استفاده باشد [۸] .

از جمله این مراکز، ISCI[1] است که توسط دکتر Peter Andrew از دانشگاه شفیلد انگلستان پیشنهاد شد. در این طرح ۵۹ رده سلولهای hES از ۱۷ مرکز سراسر دنیا مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه ۱۷ آنتی ژن سطح سلولی، ۹۳ ژن شاخص در سلولهای تمایز یافته و تمایز نیافته مورد ارزیابی قرار گرفتند، وضعیت بیان اللهای ویژه ۱۰ ژن نشانه گذاری شده و همچنین وضعیت میکروبیولوژی و هیستولوژی نمونه ها نیز بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان دهنده مشترک بودن الگوی بیان ژنی و آنتی ژنی در رده های مورد مطالعه بود علی رغم اینکه زمینه ژنتیکی گوناگونی داشتند و از آزمایشگاههای متفاوت با روشهای تولید وکشت مختلف جمع آوری شده بودند. گرچه اختلاف نامحسوس بین رده ها در فنوتیپ و یا در رفتار تمایزی را نمی توان نادیده انگاشت، ولی این مطالعه هیچ شاخص ویژه ای را برای سلولهای hES معرفی نکرد [۹].

یکی از چالشها در زمینه ایجاد مجموعه ی استاندارد، راه اندازی فناوری قابل اطمینان و ارزان و پیشرفته ای است که بتوان در غربالگریهای رایج از آن استفاده کرد، اما مشکل بزرگتر، هماهنگ شدن محققین برای تولید سلولها و رسیدن به یک توافق عمومی است تا بتوانند اطلاعات خود در مورد سلولهایhES را به اشتراک بگذارند.

موضوعاتی که برای استاندارد کردن سلولهای hES باید در نظر گرفته شود در جدول ۹ آمده است.

1- International Stem Cell Initiative

جدول ۹. موضوعاتی برای استاندارد کردن سلولهای بنیادی جنینی

چگونه رده های hES از یکدیگر قابل تشخیص هستند؟
تشخیص هویت رده های hES
آیا رده های hESC در طول زمان تغییر می کنند؟
ارزیابی پایداری سلولها در طول زمان
آیا همه hESها پرتوانی یکسانی دارند؟
ارزیابی توانایی تمایز
آیا ESCها به اندازه کافی برای استفاده های درمانی ایمن هستند؟
قوانین استاندارد آژانس دولتی

تشخیص هویت رده های سلولهای بنیادی جنینی انسانی

در اکثر مراکز تحقیقاتی بیش از یک رده سلولی نگهداری می شود.امکان اشتباه حتی در منظم ترین و دقیقترین آزمایشگاهها هم وجود دارد. به منظور جلوگیری از خطا، شناسای ویژگیهایی که خاص وشاخص سلولهای hES باشد بسیار مهم و مانع خطا در روند کار می شود. یکی از متداول‌ترین روشها، تعیین نقشه ژنتیکی STR[2] است. با توجه به اینکه STR در افراد، متفاوت است روش قابل اطمینانی برای مطالعات ارتباط ژنتیکی و تشخیص هویت والدینی است.

علاوه بر این ،تعیین تنوع SNP[3] در هر نمونه، اطلاعات صحیحی راجع به تنوع اللی یا انحراف در بین تعداد زیادی از رده های سلولیhES برای ما فراهم می نماید. تهیه پروفایل برای هر رده فقط یکبار انجام می شود و باید این داده ها در بانک اطلاعاتی برای دسترسی آزاد محققین قرار داده شود [۸].

ارزیابی پایداری در طول زمان

برخلاف درمان سلولی اتولوگ بااستفاده از سلولهای بنیادی

2- Single Tandem Repeat
3- Single Nucleotide Polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

سوماتیک مثل سلولهای بنیادی هماتوپوئیتیک که به تکثیر محدود و دستکاری کمی درمحیط آزمیشگاهی نیاز دارد، در درمان باسلولهایhES نیاز به تکثیر برای دستیابی تعداد زیاد سلول و در پی آن تمایز به یک فنوتیپ مناسب نیاز است و سپس جداسازی سلولی مورد نظر از (سلولهای تمایز نیافته، سلولهای تغذیه کننده و سلولهای تمایز یافته غیر مناسب) است. لازمه طی این مسیر، توانایی نگهداری سلولهای hES به صورت جمعیت پایدار و خودنوزا خواهد بود که توانایی تمایز به انواع سلولهای مورد نیاز را حفظ کنند. توسعه مجموعه روشهای کنترل کیفی که اجازه ارزیابی سریع مراحل سلولی را بدون استفاده از تعداد زیاد سلول فراهم کند، مهم است .جدول ۱۰ لیست فاکتورهای مورد ارزیابی در پایداری رده های سلولیhES است [۸].

جدول ۱۰. ارزیابی پایداری سلولهای بنیادی جنینی

شاخص های مرتبط با خودنوزایی
• فعالیت تلومراز
• پایداری میتوکندریایی
• روشهای استاندارد تعیین ترادف با روش میکروآرایه
پایداری ژنومی
• کاریوتیپ
• Fluorescent in situ hybridization (FISH)
• Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping
• Spectral karyotyping (SKY)
• Comparative genome hybridization (CGH)
پایداری اپی ژنتیکی
• تغییرات متیلاسیون
• تغییر وتبدیل هیستونی
• غیرفعال شدن کروموزوم X

در کنار استفاده از شاخصهای سلولهای غیر تمایزی از قبیل ژنهای مرحله غیر تمایزی وآنتی ژنهای سطحی سلول بررسی فاکتورهای دیگر که در کاهش کیفیت سلولها و تغییرات پتانسیل تمایزی آنها دخیل اند، پیشنهاد شده است. این ویژگیها عبارتند از: فعالیت تلومراز (که در سلولهای غیر تمایز یافته بالاست). متابولیسم میتوکندریایی، پایداری ژنومی و مارکرهای تغییر اپی ژنتیک از قبیل متیلاسیون DNA و تغییرات هیستونی.

دلیل انتخاب این سنجشها بر این فرض استوار شده که سلولها تحت فشار ثابت انتخابی برای تقسیم شدن و خود نوزایی قرار می گیرند که در کلیه کشتها این تغییرات تصادفی اتفاق می افتد. جهش های که مانع رشد می شوند حذف می شوند، در حالیکه جهش های که باعث مرگ نمی شوند ورشد را تسریع می کنند و یا تمایز را تغییر می دهند انتخاب خواهند شد. علاوه بر این ،اگر سلولها با این تغییر، سازش یافته و تعداد آنها زیاد باشد این تغییر در ژنوم واپی ژنوم آنها ثابت شده و سلولها بطور جبران ناپذیری در تمام مدت تغییر پیدا می کنند [۱۰]. این تغییرات در رده های سلولی [۱۱] وسلولهای ES موشی [۱۲] مشاهده شده که آن را می توان به سلولهای hES هم تعمیم داد. در نتیجه، سنجش بیان ژنهای کلیدی (مثل، تلومراز، مارکرهای ویژه چرخه سلولی) پایداری ژنومی وکیفیت اپی ژنومی (متیلاسیون، استیلاسیون هیستونها و غیر فعال شدن کروموزوم x) مجموعه پیشنهاد شده ای برای ارزیابی توانایی عملکردی سلولها و پایداری آنها خواهد بود.

تغییرات عمده ژنتیکی از قبیل از دست دادن و بدست آوردن کروموزوم و جابه جائی های بزرگ، به راحتی با انجام کاریوتیپ قابل تشخیص هستند. بهترین قدرت تفکیک[1] در سیتوژنتیک تا حد ۱۰Mb است برای تعیین تغییرات کوچکتر نقشهCNP,SNP[2]، قدرت تفکیک تا 30kb است. تغییرات هیستونی و متیلاسیون DNA تغییرات اندازه گرفتنی اپی ژنتیک است که هر دو دارای زحمت زیاد است. اما روشهای ریزآرایه روشهای ارزانی هستند که پیکره متیلاسیون هزاران عنصر تنظیمی را بررسی می کند [۸].

ارزیابی هتروژنیسیتی (ناهمگونی) و توانایی تمایز

ارزیابیهای فوق الذکر سنجش توانایی خود نوزایی سلولها و

1- Resolution
2- Copy Number Polymorphism

www.SID.ir

پایداری آنها درطول کشت را نشان میدهد.گرچه به علت تعادل ظریف بین پرتوانی وتمایز سلولهای hES را در یک حالت همگون نمی توان نگهداری کرد، حتی رده سلولی که به ظاهراً مورفولوژی حفظ شده و ثابتی دارند تغییرات اتفاقی زیادی در آنها انباشته می شود. از طرفی، رده های سلولی مختلف به علت دارا بودن اختلالات آللی در سازگاری در کشت متفاوت هستند. علاوه بر این موضوع، آزمایشگاههای مختلف معیارهای متفاوتی درباره حد تمایز قابل قبول دارند. بنابراین در قوانین استاندارد کردن باید نشانگرهایی برای حالت تمایزی نیز در نظر گرفته شود.

علت اصلی هتروژنیستی تمایز است، روشهایی که در جدول۱۱ توصیف شده در برگیرنده روشهای ارزیابی تمایز خود به خودی و پرتوانی است.

جدول ۱۱. ارزیابی ناهمگونی وتوانایی تمایز

Immunocytochemistry and immunoblot
Fluorescence- activated cell sorting (FACS) analysis
Gene expression Gene expression • Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative RT-PCR • Array hybridization methods • Massively parallel signature sequencing (MPSS)
Micro-RNA profiling
Proteomic analysis methods (two-dimensional polyacrylamide
Gel electrophoresis (PAGE), mass spectrometry, Surface Enhanced Laser adsorption and ionization (SELDI)
Functional assays
Teratoma analysis

در دسترس ترین روش ایمونوسیتوشیمی است. علاوه بر ایمونوسیتوشیمی، با استفاده از RT– PCR کمی می توان بیان ژنهای شاخص مرحله غیر تمایزی و تمایزی را بررسی کرد. استفاده از ریزآرایه ها که در حدود ده ها هزار ژن را همزمان در یک نمونه بررسی می کند در مقایسه با روشهای بیان ژنی ارزانتر می باشند گرچه دقت کمتری دارد. روشهای مولکولی دیگر از قبیل تعیین پروفایل میکرو RNA و سنجشهای پروتئینی در حال توسعه در آزمایشگاههای تحقیقاتی است.

Archive of SID

آزمونهای نهایی پرتوانی، ارزیابی بیولوژیکی تمایزاست مثل آنالیز الکتروفیزیولوژی نورون و ماهیچه، آنالیزهای هیستولوژی تتراتوما مشتق شده از پیوند سلولهایhES .نکات قابل توجه در این ارزیابیها عبارتند از:

۱- عدم توافق همگانی در استفاده از مارکرها، معمولاً مارکرهایی که به سلولهای غیر تمایزی محدود میشوند در انواع دیگر سلولها به عنوان شاخص وجود دارد.

۲- چه چیز تفاوتهای سنجش به سنجش را تعیین می کند.

۳- شناسایی محدودیتهای هر سنجش

باتوجه به تنوع آزمایشات دستیابی به یک توافق عمومی بر طبق مارکرهای استاندارد که توسط مجامع علمی و بین اللمللی شناخته شده باشد توصیه شده است این علائم شامل معرفی آنتی بادیها و پرایمرهای PCR به همراه روشهای چگونگی استفاده از آنها و چگونگی تفسیر نتایج آنها است [۸].

استانداردهای مرجع

ISCI رده تراتوما مرجعی را برای تعدادی از آزمایشات ارائه داده که این امکان را فراهم می کند تا بتوانند نتایج حاصل را با استانداردهای مرجع مقایسه کنند. البته انتخاب مناسبترین رده سلولی به عنوان استاندارد مرجع موضوع قابل بحث است. جدول ۱۲ معایب و مزایا ۳ نوع رده سلولی یعنی رده سلولهایhES نرمال، یک رده سلولهایhES که به لحاظ کاریوتیپ غیر طبیعی است و یک رده سلولی تراتوکارسینوما را بر شمرده است. در حالی که انتشار اطلاعات مربوط به ۲۰-۱۰ رده یک نقشه معقولانه است ولی اجرا کردن این استراتژی بسیار مشکل است. از جمله مشکلات می توان به موارد زیر اشاره نمود: توافق عمومی بر انتخاب روش معقولانه، شناسایی رده هایی که به عنوان استاندارد قابل استفاده باشند و شناسایی گروهی یا آژاتسی که بودجه این تلاشها را تأمین کند و ملزم به اجرای این استانداردها کند [۸].

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱۲. رده های سلولی مورد استفاده در استانداردهای مرجع

نوع رده	مزایا	معایب
رده ESC استاندارد مورد توافق	• نوع سلولی که آزمایش می شود یکسان است • اطلاعات جمع آوری شده ممکن است برای مطالعات قبل از درمان بکار رود	• تصمیم گیری برای انتخاب رده استانداردی که درNIH ثبت شده است و یا مشتقات جدیدتر • نیازمندیهای کشت پیچیده است • ناپایداری در کشت • ارزش بالای سلولهای حاصل • اداره ثبت رده های سلولی آمریکا، اجازه توزیع رایگان سلولهای hESC نرمال را در سطح آمریکاممنوع کرده است
واریته هایی از سلولهای hES که کاریوتایپ غیر طبیعی دارند	• توزیع شده توسط ATCC (با ارزش پایین) • دارای مدارک و تاریخچه گسترده • اطلاعات میکروآرایه ای و MPSS قابل دسترس • تحت پوشش حق امتیاز آمریکا قرار ندارند	• شرایط کشت نسبتاً پیچیده رشد • رشد سریعتر از سلولهای طبیعی • نگهداری پرهزینه
رده کارسینومای جنینی انسان	• منتشر شده توسط ATCC (با ارزش پایین) • روش های کشت ساده • دارای مدارک و تاریخچه گسترده • اطلاعات میکروآرایه ای و MPSS قابل دسترس • رشد بسیار سریعتر است ازسلولهایhES	• شاخص سلولهای زاینده مثل شاخص های ESC حفظ شده است • فهرست تمایز کامل نشده است • آنیوپلوئیدی از مطالعات تمایز به سلولهای زاینده جلوگیری می کند

NIH: National Institutes of Health
ATCC: American Tissue and Cell Collection
MPSS: Massively parallel signature sequencing

نتیجه گیری و چشم انداز آینده

برطبق دستور EU(2004/24/EC,2003/94) سلولهای مشتق از hESC که به منظور پیوند مورد استفاده قرار می گیرند، برای تضمین ایمنی و کیفیت سلول باید تحت شرایطG.M.P[1] کشت داده شود. شناسایی همه شرایط کشت و تولید hESC برای انجمن استانداردهای GMP، از جمله چالش‌ها است. به این معنی که کلیه مراکز تحقیقاتی که کشت سلولی برای استفاده در درمان انجام میدهند باید به خوبی تحت کنترل خود قرار گیرند.

مراکز تحقیقاتی که کشت سلول با هدف سلول درمانی انجام می دهند باید پیشرفته و تحت کنترل باشند، تولیدات استاندارد بالائی داشته باشند و همچنین باید فاکتورهای دیگری را لحاظ کنند که عبارتند از: مدیریت کارکنان، ثبت گزارشات، کنترل روشها، کالیبراسیون، مدیریت خطا، روشهای استاندارد سازی قابل اجرا، روند دایمی (مستمر) تحقیق، نشان دار کردن محصولات، کنترل کیفیت، ارزیابی (حسابرسی)، ارتقاء سطح تجهیزات و امکانات استاندارد [۱۳].

علاوه بر تولید با کیفیت رده های hESC برطبق قوانین GMP، مراحل بعدی به طرف تولید و نگهداری با شرایط مشخص سلولهای بنیادی جنینی انسانی خواهد بود به این ترتیب که:

1- Good Manufacturing Practice

www.SID.ir

– تولید رده های جدید hESC با استفاده از روش مکانیکی و یا بدون استفاده از مواد حیوانی

– استفاده از سلولهای تغذیه کننده مشتق از انسان یا شرایط بدون لایه مغذی با استفاده از سوبسترای با منشاء انسانی یا سوبسترای نو ترکیب

– استفاده از محیط کشت با ترکیبات مشخص در کشت سلولهای hES

سلولهای hES مورد استفاده برای اهداف درمانی باید به لحاظ ژنتیکی و اپی ژنتیکی نرمال باشند، سرعت نتایج تحقیقاتی در طی چند سال اخیر، به اندازه ای است که می توان استفاده از روش درمان سلولی با استفاده از سلولهای hES در علم پزشکی را نوید داد هر چند هنوز موانعی در برخورد با آن وجود دارد [۷].

تجهیزات و مواد مورد نیاز برای تولید، کشت و نگهداری سلولهای بنیادی جنینی موشی و انسانی

(ضمیمه۱) وسایل مورد نیاز

۱) هود لامینار کلاس I و II مجهز به لامپUV، ۲) انکوباتور (درصدCO2۵,درجه سانتی گراد۳۷ و رطوبت ۹۵ درصد)، ۳) میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، ٤) میکروسکوپ استریو با سیستم نورپردازی گذاره ۵) تانک نیتروژن مایع، ٦) سانتریفیوژ معمولی، ۷) بن ماری ۸) فریزردرجه سانتی گراد۷۰ – ودرجه سانتی گراد۲۰– و یخچال معمولیدرجه سانتی گراد٤ ۹) ترازو با دقت حداقل ۰/۱ میلی گرم ، ۱۰) کپسول CO2 ۱۱) میکروسکوپ الکترونی گذاره[1] ، ۱۲) پمپ خلاء، ۱۳) پیپت دهانی ۱٤) سمپلرهای متغیر 0.5-10µl , 10-100 µl , 100-1000 µl ۱۵) سمپلر متغیر چندکاناله 10-200 µl، ۱٦) میکروسکوپ فلورسنس و دوربین، ۱۷) لام شمارش سلول (هموسایتومتر)

1- Transmitted

(ضمیمه ۲) مواد مورد نیاز

Archive of SID

نام ماده	شماره کاتالوگ	شرکت سازنده
Dulbecco's modified Egle medium(DMEM)	12800-058	Gibco
Dulbecco's phosphate Buffered saline(D-PBS)	21600-051	Gibco
Gelatin (Type A)	G2500	Sigma
ESGRO (LIF)	ESG1107	Chemicon
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	D 2650	Sigma
ES cell qualified Fetal bovine serum (ES-FBS)	16141-079	Gibco
Fetal bovine serum (FBS)	11140-035	Gibco
L-Glutamine-200 mM (100X), liquid	25030-081	Gibco
HBSS(10X)	14185-045	Gibco
KnockOut™ D-MEM	10829-018	Gibco
MEM Non-Essential Amino Acids Solution 10 mM (100X), liquid	11140-035	Gibco
2- Mercaptoethanol (ß-ME)	M7522	Sigma
Mitomycin C	M0503	Sigma
Guinea Pig complement	1919	IMVS Veterinary Services Division
Trypsin-EDTA (1X), liquid 0.05% Trypsin, 0.53 mM EDTA•4Na.	25300-054	Gibco
Mineral oil	M8410	Sigma
Anti- mouse whole serum	M 5774	Sigma
Anti- human whole serum	H7865	Sigma
Penicillin-Stereptomycin	15140-148	Gibco
NaHCo3	S-5761	Sigma
rmNoggin	1967-NG	R&D
Fibroblast Growth Famltor-Basic,Human	F0291	Sigma
KnockOut SR	10828-028	Gibco
DMEM : F-12	21331-020	Gibco
ECM gel From Engelbreth Holm-Swarm Mouse Sarcoma (Matrigel)	E1270	Sigma
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid (EGTA)	E 4378	Sigma
Pregnyl(HCG;Human chorionic gonadotrophin)		Organon
Folligon (PMSG;Pregnant Mare Serum Gonadotrophin)		Intervet

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدهای آمینه غیرضروریMEM

اسیدهای آمینه غیرضروری MEM در جدول زیر ذکر شده، غلظت نهایی مورد استفاده ۰/۱mM است. اسیدهای آمینه به صورت‌مخلوط و ×۱۰۰ (۱۰mM) قابل خریداری هستند.
این محلول در ٤ درجه سانتی گراد قابل نگهداری است ولی می‌توان برای افزایش نیمه عمر آن را در۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری نمود.

اسیدهای آمینه غیرضروریMEM

اسیدهای آمینه	100xLiquid g/L
L-Alanine	۸۹۰/۰۰
L-Asparagine	۱۳۲۰/۰۰
L-Aspartic Acid	۱۳۳۰/۰۰
L-Glutamine Acid	۱۴۷۰/۰۰
Glycine	۷۵۰/۰۰
L-Proline	۱۱۵۰/۰۰
L-Serine	۱۰۵۰/۰۰

بتامرکاپتواتانول یا ۲ مرکاپتواتانول

بتامرکاپتواتانول به عنوان آنتی‌اکسیدان به محیط کشت اضافه می‌شود. غلظت نهایی مـــــورد استفاده0.1mM(٤M-۱۰) است. لازم به ذکر است که محلول Sigma آن M ١٤ است.
بنابراین با افزودن ۷۰µl از آن به ۱۰ml از PBS محلول ذخیره ۰/۱Mساخته می‌شود. به هنگام استفاده محلول ذخیره۰/۱ M باید ۱۰۰۰ برابر رقیق شود.

پنی سیلین ـ استرپتومایسین

پنی سیلین و استرپتومایسین به ترتیب با غلظت ۵۰IU/ml و ۵۰µg/ml مورد استفاده قرار می‌گیرد. محلول ذخیره آن با غلظت×۱۰۰ است و هنگام استفاده باید صد برابر رقیق شود. محلول ذخیره به صورت تقسیم‌بندی شده در دمای۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی(LIF)

در این طرح از(Chemicon, ESGRO, 107IU) LIF استفاده شد.
برای افزایش نیمه عمر آن ویال اصلی تا زمان استفاده بصورت‌منجمد نگهداری شد. هنگام استفاده، ابتدا محتویات ویال اصلی به ۱۰ ویال۱۰۰µl، ۱۰۷IU تقسیم شد. و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید و هنگام مصرف ۹۰۰µl PBS بدون Ca2+ و Mg2+ به آن اضافه شد غلظت حاصل ۱۰٦IU شد. ویال مذکور در ٤ درجه‌سانتی‌گراد قابل نگهداری است.

محلول EGTA ×۱۰۰(stock)

۱) ۹۵۱mg EGTA را وزن کنید.
۲) ٤۹/٤ میلی لیتر آب فاقد یون به آن اضافه نمایید.
۳) مقدار ٦۰۰µl از محلول ۱۰M سود به آن اضافه نمایید (pH=8) تا حل شود.
٤) محلول فوق را با فیلتر۰/۲۲ µ l فیلتر نمایید
۵) در دمای اتاق نگهداری کنید.
٦) این محلول ۵۰mM و با غلظت×۱۰۰ است.

محلولPBS-EGTA ×۱(working)

۰/۵ml از محلول EGTA(۵۰mM) ×۱۰۰ را برداشته و ٤۹/۵ ml از محلولPBS فاقد Mg2+ و Ca2+ (pH=7.5) اضافه نمایید.

(ضمیمه۳) ظروف و وسایل مصرفی

وسایل مصرفی	شرکت
Tissue culture flasks (25,75,150cm2)	Flacon& TPP
Syringe (1ml)	Supa
Pipette Tips (1000ml)	Treff
Rack & storage	Nunc
Test plates (4-well)	Nunc
Test plates (6,12,24&96-well)	TPP
Test plates (24-well)	TPP
Serological pipettes (1,2,5,10&25ml)	TPP
Centrifuge tubes (15&50ml)	TPP
Syring filter	TPP
vacuum filter system	TPP
Tissue culture dishes	Flacon&TPP
Tissue culture central well	Flacon
Cell scrapers	TPP
Cryo tubes	Nunk&TPP
Cryo box	TPP
Rack&Storage	TPP

www.SID.ir

Archive of SID

این محلول را در دمای اتاق بسازید و pH آن را با HCl به ۲/۵ برسانید. PVP برای افزایش ویسکوزیته و کاهش چسبندگی جنین به محلول اضافه می شود. محلول آماده شده را فیلتر کنید و در مقادیر مورد استفاده تقسیم بندی کرده سپس در فریزر ۲۰- نگهداری کنید.

همچنین این محلول به صورت تجاری از شرکت Sigma با شماره کاتالوگ T1788 و از شرکت Specialty Medin با شماره کاتالوگ MR- 004D قابل خریداری است.

ضمیمه٤ طرز ساخت اسید تایرود

آماده سازی محلول اسید تایرود برای حذف ناحیه شفاف

نام ماده	gr/100 ml
NaCl	0.8
KCl	0.02
CaCl2.2H2O	0.024
MgCl2.6H2O	0.010
glucose	0.100
Polyvinylpyrrolidone(PVP)	0.400

References

1. **Zeng X, Rao MS.** Human embryonic stem cell: long term stability, absence of senescence and potential cell source for neural replacement. Neuroscience 2007; 145: 1348-58.
2. **Thomson JA. Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
3. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
4. **Amit M., Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA.** Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferate potential for prolonged periods of culture. Dev Biol 2000; 227: 271–8.
5. **Vítezlav B, Sonia B, Lukás C, Clare LP, Catherine M, Schwartz YL, Mahendra SR, Ernest A.** An Efficient Method for the Derivation of Mouse Embryonic Stem Cells. Stem Cells 2006; 24: 844-9.
6. **Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK.** Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells on defined matrices with conditioned medium. Nat Biotechnol 2001; 19: 971-4.
7. **Skottman H, Narkilahti S, Hovatta O.** Challenges and approaches to the culture of pluripotent human embryonic stem cells. Regenerative Med 2007; 2: 265-73.
8. **Jenne FL, Mahendra SR.** Establishing standards for the characterization of Human embryonic stem cell lines. Stem Cells, (2005), 24; 145-150.
9. **Peter W Andrews et all.** Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. Nature Biotechnology, (2007), 25; 803 – 816.
10. **Xianmin Zeng, Mahendra S.Rao.** The therapeutic potential of embryonic stem cell: A focus on stem cell stability. Current Opinion in Molecular Therapeutics, (2006), 8; 338-344.
11. **Bylund L, Kytola S, Lui WO, Larsson C, Weber G.** Analysis of the cytogenetic stability of the human embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches. Cytogenet Genome Res 2004; 106: 28-32.
12. **Longo L, Bygrave A, Grosveld FG, Pandolfi PP.** The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. Transgenic Res 1997; 6: 321-8.
13. **Zuck T.** Current good manufacturing practices. Transfusion 1995; 35: 955–66.

www.SID.ir