Archive of SID

AUMJ Journal Alborz University of Medical Sciences
نشریه دانشگاه علوم پزشکی البرز،پاییز۱۳۹۹، سال ۹، شماره ۴، صفحه‌های ۴۰۵-۴۱۴
مقاله تحقیقی

تعیین خصوصیات لاین سلولی BHK-21C5 و معرفی آن جهت استفاده در مطالعات تحقیقاتی، تشخیصی و تولید فرآورده‌های بیولوژیک

فرشته ضیائی فر[1]، سینا سلیمانی[2*]، محسن لطفی[3]

[1] کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
[2] دکترای تخصصی ویروس شناسی، استادیار دپارتمان بیوبانک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[3] دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشیار دپارتمان کنترل کیفی واکسن‌های ویروسی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۷/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲٤

چکیده

زمینه و هدف: مطالعات متعددی برای استفاده از لاین‌های سلولی در مطالعات تحقیقاتی، تولید و فرآوری داروها و فراورده‌های بیولوژیک و تشخیص سمیت و اثربخشی مواد صورت گرفته است. مطالعه حاضر به منظور بررسی خصوصیات لاین سلولی BHK-21 C5 به عنوان یک بستر مناسب جهت استفاده در فرآیند تولید و کنترل کیفیت واکسن و یا کشت ویروس‌ها و مطالعات تحقیقاتی و تشخیصی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کاربردی- توسعه ای با تهیه بذر سلولی مناسب، سلول به روش Limit dilution کلون شد. پس از بررسی ویژگی‌های رشد سلول، آزمایشات سترونی برای بررسی آلودگی‌های باکتریایی، قارچی، مایکوپلاسمایی و مایکوباکتریومی و آزمایش‌های تعیین هویت سلول با استفاده از آزمایش‌های مولکولار در کنار لاین‌های سلولی CHO، LK، RBK، MRC5، و Vero و کاریوتایپینگ انجام شد. همچنین بذر سلولی مادر از جهت وجود ویروس‌های ناخواسته، در روش مستقیم از طریق ایجاد ضایعات سلولی در طول دوره انکوباسیون و در روش غیرمستقیم با استفاده از آزمایش‌های Heamadsorption، تزریق به تخم مرغ جنین‌دار، تزریق به موش بالغ و شیرخوار مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: آزمایش‌های انجام شده بر روی لاین سلولی مذکور نشان می‌دهد که این سلول دارای ویژگی‌های رشد مناسب بوده و فاقد آلودگی‌های متقاطع می‌باشد. همچنین هویت سلول با روش‌های کاریوتایپینگ و مولکولار تایید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش‌های مختلف نشان می‌دهد که این لاین سلولی الزامات لازم برای استفاده در تولید و کنترل کیفیت فرآورده‌های بیولوژیک و همچنین مطالعات تحقیقاتی را دارا می‌باشد.

کلمات کلیدی: لاین سلولی BHK، تعیین خصوصیات، کاریوتایپینگ، واکسن، بذر سلولی مادر

نویسنده مسئول:
دکترای تخصصی ویروس شناسی، استادیار دپارتمان بیوبانک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، صندوق پستی ۱۴۸-۳۱۹۷۵، کرج، ایران

۰۹۱۲۱۷۷۸۱۰۳
E-mail: s.soleimani@rvsri.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تکنولوژی کشت سلول، در طول قرن اخیر به طور گسترده‌ای افزایش یافته است بطوری که تاثیر این تکنولوژی بر جامعه بشری و پیشرفت آن بر علم بیولوژی قابل توجه بوده است.[۱] فرآیند کشت به پاساژ سلول‌های جداشده از بافت اصلی، کشت اولیه یا از لاین سلولی که جداسازی آن به صورت آنزیمی، مکانیکی و یا شیمیایی صورت می‌گیرد، اطلاق می‌گردد که می‌تواند به شکل یک مونولایر روی سطح جامد یا به شکل سوسپانسیون کشت شود.[۲] طی این فرایند سلول‌ها تحت شرایط کنترل شده‌ای در بیرون از محیط داخلی بدن رشد می‌کنند که معمولا شامل مواد مغذی ضروری (اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی)، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و گازها (CO_2, O_2) با تنظیم محیط فیزیکوشیمیایی(pH، فشار اسمزی، دما) می‌باشد.[۳] از کاربردهای آن می‌توان به ارزیابی اثربخشی و یا سمیت داروهای جدید، تولید واکسن و بیوداروها اشاره کرد.[۴] انواع کشت سلول از کشت‌های پرایمری، سلول‌های دیپلوئید و لاین‌های سلولی پیوسته شکل می‌گیرند.[۲] سلول‌های فیبروبلاستی به طور گسترده در کشت‌های پرایمری ناپایدار یا در لاین‌های سلولی پایدار و ترانسفورمه به کار گرفته شده است. اخیرا فیبروبلاست‌ها به عنوان منابعی جهت مدل سازی بیماری در طی برنامه ریزی‌های سلولی مناسب شناخته شده است.[۵] لاین سلولی فیبروبلاستی BHK-21 در سال ۱۹۶۱ از کلیه پنج همستر طلایی سوری به نام مزوکریستوس آرئوتوس یک روزه جدا شد.[۶] این لاین سلولی از ATCC و سایر آزمایشگاه‌هایی که آن را به صورت منحصر به فرد نگهداری می‌کنند، قابل تهیه است.[۶] این سلول یکی از رایج‌ترین سلول‌های کاربردی جهت آماده سازی بذرهای ویروسی و تولید واکسن‌هاست.[۷] طی پژوهشی که توسط Perrin و همکاران در سال 1995انجام شد، از کشت سوسپانسیون BHK-21 برای تهیه آزمایشی واکسن هاری استفاده کردند.[۸] همچنین Birrl و همکاران درسال ۱۹۹۲، موفق به تولید فاکتور رشد فیبروبلاست بنیادی با استفاده از دستکاری این لاین سلولی به وسیله پلاسمید pSV2/neo شدند.[۹] هدف از انجام این مطالعه بررسی متناسب بودن لاین سلولی BHK موجود در ایران جهت تولید و کنترل کیفیت واکسن و مطالعات تحقیقاتی- تشخیصی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کلون کردن سلول‌ها

پس از تهیه کرایوتیوپ حاوی سلول BHK-21 C5 M007 از بانک سلول موسسه رازی، کلونینگ سلول به روش Limit dilution روی میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد و کلون‌های برتر از چاهک‌هایی که دارای یک سلول واحد بودند با بررسی روزانه و متوالی کیفیت و سرعت رشد و تکثیر، انتخاب و در میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای با محیط DMEM و ۱۰ درصد سرم کشت شدند.[۲] پس از انتقال کلون‌های سلولی منتخب از میکروپلیت به فلاسک، طی سه پاساژ متوالی ضمن حفظ و تکثیر سلول، در نهایت ٤ کلون سلولی به عنوان برترین کلون‌ها از لحاظ پایداری و ماندگاری سلول‌ها ذخیره سازی شد.

پاساژ Master cell جهت دست‌یابی به Working cell و کرایوپریزرویشن

با تهیه Master cell از ویال‌های Parent cell و تریپسینه کردن مونولایر سلولی پاساژ دهم BHK-21 در کنار افزودن محیط DMEM، محلول حاوی بذر سلول ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰rpm سانتریفوژ شد. رسوب ته‌نشین شده با افزودن مجموع ۲۰ میلی‌لیتر سرم گاوی و DMSO به صورت هموژن در آمد و بین کرایوتیوپ‌ها تقسیم شد و در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد ذخیره سازی شد.

بررسی ویژگی‌های رشد سلول

کرایو ویال اول از بذر سلول مادر و کاری در فلاسک سلول کشت گردید و خصوصیات رشد سلول ازجمله درصد بقا، موفولوژی سلول، زمان دو برابر شدگی سلول و ضریب μ، هموژنیسیتی و منحنی رشد سلول‌های BHK بر اساس نتایج روزانه شمارش سلول تعیین شد.[۲]

آزمایش سترونی

بذر سلول مادر و کاری از منظر سه نوع آلودگی مورد سنجش قرار گرفت الف) باکتریایی: ۰/۵ml از عصاره سلولی به محیط‌های تایوگلیکولات و TSB تلقیح شد و در دمای‌های مختلف به مدت

www.SID.ir

Archive of SID

۱٤ روز انکوبه شد. ب) مایکوپلاسمایی: با تزریق یک میلی لیتر عصاره سلولی با چرخه ذوب و انجماد به ۱۰ ml محیط کشت pplo broth و حدود ۰/۲ml روی محیط pplo agar کشت شده و به مدت ۲۱ روز در شرایط هوازی و بی‌هوازی انکوبه شد. ج) مایکوباکتریومی: ۰/۵ml عصاره سوسپانسیون غلیظ سه مرحله فریزتاو شده به دو لوله محیط لون اشتاین تلقیح شد و مدت ٤٥ روز به صورت خوابیده در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار گرفتند.[۱۰]

کاریوتایپ

جهت توقف سلول‌ها در مرحله متافاز کلشی‌سین با غلظت ۰/۰٤ درصد میلی‌گرم/ میلی‌لیتر افزوده و ٤ تا ۵ ساعت انکوبه شد. مونولایر سلولی پس از شستشو با PBS، تریپسینه شد و اثر آن با افزودن سرم خنثی‌سازی شد. سوسپانسیون سلولی با افزودنPBS و پیپتینگ سلول‌ها و ۵ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ rpm رسوب داده شد. در مرحله بعد با افزودن محلول kcl، ۰/۰۷۵ مولار، ۲۰ دقیقه درون بن‌ماری انکوبه و پس از سانتریفوژ و خروج kcl، رسوب ایجاد شده به حالت سوسپانسیون در آمد و با افزودن فیکساتیو سرد، ٢٤ ساعت در یخچال قرار گرفت. افزودن فیکساتیو ۳ مرحله دیگر تکرار و سانتریفوژ انجام شد. در نهایت ۲ تا ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی از فاصله ۲۰ سانتی‌متری و با زاویه ٤٥ درجه بر روی لام سرد چکانیده شد و با رنگ‌آمیزی به وسیله رنگ گیمسا تعداد کروموزوم‌های سلول در هر میدان شمارش گردید.[۱۱]

تعیین هویت سلول با تکثیر ژن اختصاصی گونه توسط PCR

سوسپانسیون غلیظی از هر یک از لاین های سلولی BHK در کنار لاین‌های سلولی CHO (Chinese hamster ovary)، Vero (Monkey Green Kidney)، RBK (Razi Bovine Kidney)، سلول دیپلوئید MRC5، پرایمری LK (Lamb kidney) و سلول پرایمری GL (Goat Lymphocyte) تهیه و ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از سه بار شستشو با محلول PBS به منظور استخراج DNA از کیت استخراج و تخلیص DNA (شرکت تکاپو زیست) استفاده گردید و تکثیر قطعه‌ای از ژن زیرواحد ۱ سیتوکروم C اکسیداز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه دریافتی از شرکت تکاپو زیست انجام شد.[۱۲] برای انجام PCR از کیت شرکت سیناژن استفاده شد. از سلول CHO با منشا هامستر به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. تکثیر ژن COI در دستگاه ترموسایکلر طبق دستورالعمل کیت، با ۵ دقیقه دناتوراسیون در $95^{\circ}C$ و سپس طی ۳۰ تا ۳۵ سیکل شامل سه مرحله دناتوره شدن (Denaturation)، اتصال پرایمرها (Annealing) و گسترش یا طویل‌سازی (Extensionor Elongation) انجام شد. در نهایت برای مدت ۱۰ دقیقه عمل گسترش در $72^{\circ}C$ ادامه یافت تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل گردد، سپس الکتروفورز انجام شد.[۱۳]

پرایمرهای گونه‌های دیگر به شرح جدول ۷ در کنار پرایمر هامستر گذاشته شد.

جدول ۱: ردیف پرایمرهای گونه اختصاصی[۱۲]

Species	Sequence
Cricetulus griseus (ch.Hamster)	Cg-F- ACTAACCCGCTTCTTCGCATTC Cg-R- GCGTAGGCGAACGGAAGTATC

جدول ۲: ردیف پرایمرهای گونه های دیگر[۱۲]

نام گونه	توالی(´۳ به ´۵)	طول قطعه تکثیر شونده
Capra hircus(goat)	F- ATATCAATCGGGTTTCTAGGATTTATT R- AGTTGGGATAGCGATAATTATGGTAGT	117(bp)
Bos taurus (cow)	F- GCTATTCCAACCGGGGTAAAAGTC R- GAAAATAAAGCCTAGGGCTCAC	102 (bp)
Ovis aris (sheep)	F- CGATACACGGGCTTACTTCACG R- AAATACAGCTCCTATTGATAAT	267 (bp)
Homo sapiens(human)	F- TAGACATCGTACTACACGACACG R- TCCAGGTTTATGGAGGGTTC	391(bp)
Cercopithecus aethiops (Gr. Monkey)	F- CTTCTTTCCTGCTGCTAATG R-TTTGATACTGGGATATGGCG	222(bp)

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی آلودگی بذر سلول مادر به ویروس‌های ناخواسته

بررسی وجود ویروس‌های ناخواسته در بذر سلول از طریق کشت

این آزمایش به دو صورت مستقیم از طریق ایجاد ضایعات ویروس روی سلول (CPE) در طول دوره انکوباسیون کشت سلول یا به صورت غیرمستقیم با جذب گلبول‌های قرمز خوکچه هندی و یا جوجه توسط بستر سلولی، امکان آلودگی ویروسی سلول مورد مطالعه را مشخص می‌نماید.[۱۴] برای انجام این آزمایش ml ۵ سوسپانسیون غلیظ حاوی $۱/٤\times۱۰^{۷}$ سلول در یک لوله تهیه شد. در فریزر $-۷۰^{o}C$ قرار داده شد و سه مرتبه فریزتاوگردید. پس از آن ۲۰ دقیقه با g۸۰۰ (حدود rpm ۲۸۰۰) سانتریفیوژ گردید و مایع رویی برداشت شده و تا قبل از تلقیح به فلاسک‌های کشت سلول نشانگر در فریزر ذخیره شد. سپس سه لاین سلول RBK, CHO, Vero به عنوان سلول‌های نشانگر انتخاب و کشت داده شدند. برای هر کدام از لاین‌های سلولی سه فلاسک با عنوان نمونه مورد آزمایش، کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته و به هریک از فلاسک‌های آزمایش یک میلی‌لیتر از عصاره سلولی BHK افزوده و به مدت ۱ ساعت به منظور جذب انکوبه شد. نمونه‌های کنترل مثبت لاین‌های سلولی RBK, CHO, Vero به ترتیب به ویروس‌های سایتوپاتیک سرخک، ویروس غیرسایتوپاتیک اوریون و پاراآنفلونزای تیپ ۳ گاوی (PI3) (Bovine Parainfluenza-3 Virus) آلوده شدند. محیط DMEM با ۲٪ سرم تهیه شده (محیط نگهدارنده) به تمام فلاسک‌ها افزوده و در دمای $۳۷^{o}C$ با ۵٪ CO_2 به مدت ۱٤ روز انکوبه شد. برای انجام آزمایش Haemadsorption شش فلاسک کشت از سه لاین سلول RBK, CHO, Vero حاوی عصاره سلولی BHK همراه سه فلاسک کنترل منفی ۱٤ روز انکوبه شدند. به سه فلاسک از هر سلول ml ٤ از محلول ۰/۵ ٪ گلبول قرمز جوجه و به سه فلاسک دیگر هم به همین میزان گلبول قرمزخوکچه هندی اضافه شد. به فلاسک کنترل منفی هر سه سلول ml ٤ از مخلوط گلبول قرمز خوکچه و جوجه افزوده و از محلول ۰/۵٪ گلبول قرمز خوکچه ml ٤ به فلاسک کنترل مثبت (سلولVero آلوده به ویروس اوریون) اضافه شد. کلیه فلاسک‌ها ۳۰ دقیقه در دمای$٤^{o}C$ و ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و پس از شستشو سطح سلول‌ها با PBS، مورد پایش قرار گرفتند.

بررسی وجود ویروس‌های ناخواسته در بذر سلول با تزریق به تخم‌مرغ جنین دار

۰/۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل از سانتریفوژ عصاره سلولی فریزتاو شده به مایع الانتوئیک ۱۰ تخم‌مرغ جنین دار SPF ۱۰ روزه تزریق گردید و ۵ تخم‌مرغ جنین‌دار به عنوان شاهد در نظر گرفته و ٦ روز پس از انکوباسیون در دمای $۳۷^{o}C$ در یخچال قرار گرفتند. آزمایش هماگلوتیناسیون تسریع شده (Rapid Haemagglutination) با افزودن ۵۰ میکرولیتر از مایع الانتوئیک تخم‌مرغ‌ها داخل هر گوده میکروپلیت و ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز خوکچه انجام شد. گلبول قرمز خوکچه و نمونه ویروس نیوکاسل به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. مشابه همین روش با مایع الانتوئیک تخم‌مرغ‌های آزمایش و شاهد با گلبول قرمز جوجه انجام شد.[۱۵]

بررسی وجود ویروس‌های ناخواسته در بذر سلول مادر با تزریق به موش بالغ و شیرخوار

۵ میلی‌لیتر عصاره سلول لیز شده BHK به ۱۰ سر موش بالغ مورد آزمایش هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی تزریق شد و ٦ سر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به ۱۰ سر موش شیر خوار یک روزه هر کدام مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت صفاقی تزریق و با ۱۰ سر موش شاهد به مدت ٤ هفته مورد بررسی قرار گرفتند.[۱۶]

آزمایش تومورزایی (Tumorgenicity)

به ۱۰ موش nude نوزاد، $۱۰^{۷}$ سلول BHK یا سلول‌های توموری کنترل مثبت یعنی سلول Hela (دارای خاصیت تومورزایی پیشرونده)، هر موش ۰/۱ میلی لیتر با سرم فاقد محیط کشت به صورت زیر جلدی تلقیح شد. موش‌ها در فواصل منظم و متوالی به مدت سه هفته از نظر شکل گیری ندول ها در محل تزریق مورد بازرسی قرار گرفتند. در هر موش پس از مرگ یا کشته شدن و یا در انتهای دوره بازرسی یک نکروپسی انجام گرفت. این نکروپسی شامل آزمایشی مبنی بر شکل گیری تومور در محل تزریق و در همه

www.SID.ir

Archive of SID

ارگان‌های عمده از قبیل گره‌های لنفاوی، ریه‌ها، مغز، طحال، کلیه‌ها و کبد بود.

ملاحظات اخلاقی

در این پژوهش، تمامی اصول اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی با شماره مصوب RVSRI.REC.98.005 رعایت شده است.

یافته‌ها

تعیین خصوصیات رشد سلول: الف) موفولوژی سلول

در طول این مطالعه کشت سلول BHK، به صورت یک منولایر سلولی یک نواخت (شکل ۱) تشکیل شد. ب) درصد بقای سلول: تعداد سلول‌های زنده‌ی شمارش شده در لام نئوبار برابر با ۹۴،۱۰۷،۱۰۵،۹۷ و تعداد سلول‌های مرده برابر با ۵۸،۶،۷ بود و درصد بقا ۹۲٪ محاسبه شد. ج) زمان دو برابر شدن سلول و ضریب μ: با رسیدن سلول‌ها به فاز لگاریتمی رشد، شمارش سلول‌ها در فواصل منظم صورت گرفت که به ترتیب برابر با ۲۰/۵ساعت و ۰/۰۳ به دست آمد. د) منحنی رشد سلول: شمارش روزانه تعداد سلول‌ها طی ۷ روز انجام شد و منحنی رشد سلول‌ها طبق نتایج به دست آمده ترسیم شد(نمودار ۱).

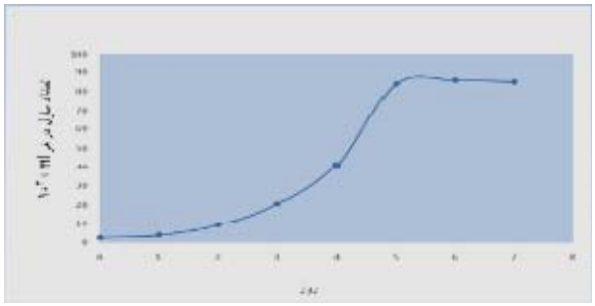
آزمایش سترونی

با انجام آزمایش‌های سترونی مشخص شد بذر سلول مادر (Master Cell) و کاری (Working Cell) از نظر وجود عوامل باکتریایی، مایکوپلاسمایی و مایکوباکتریومی فاقد هر گونه آلودگی بودند.

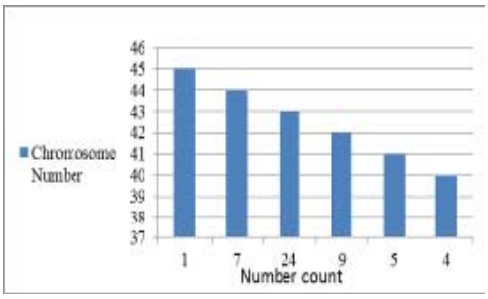
کاریوتایپ

به منظور تعیین مورفولوژی و تنوع کروموزومی، لاین سلولی کاریوتایپ گردید که نتایج به شرح زیر است (شکل ۲و۳، نمودار۲).

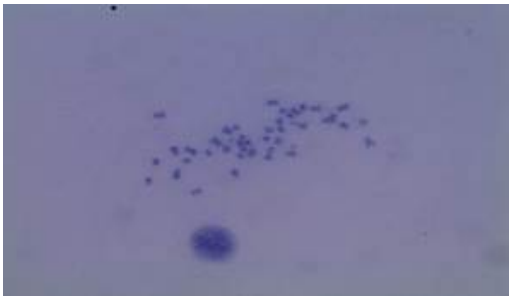
شکل۱ : کشت سلول BHK با بزرگنمایی X ۱۰۰



نمودار ۱ : منحنی رشد سلول BHK



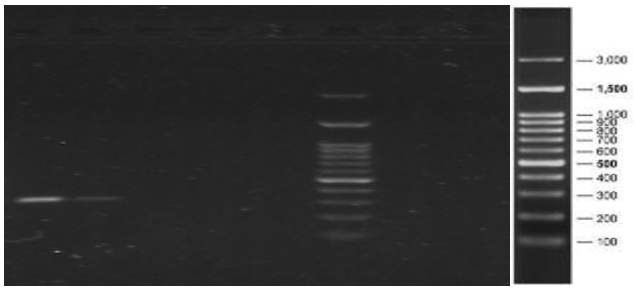
نمودار۲: نمودار تنوع کروموزوم در بذر سلول BHK



شکل۲: یک نمونه از کاریوتایپ سلول BHK با۴۳ کروموزوم

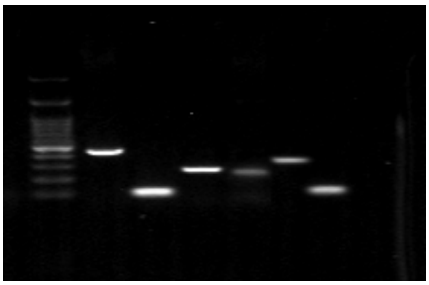
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز یک (CO1) میتوکندریایی سلول BHK ستون ۱ : سلول BHK با پرایمر هامستر 315bp، ستون ۲ : سلول CHO با پرایمر هامستر، ستون ۳: سلول BHK با پرایمر گوسفند، ستون ٤: سلول BHK با پرایمر بز، ستون ٥: سلول BHK با پرایمر میمون، ستون ٦: سلول BHK با پرایمر انسان، ستون ۷: سلول BHK با پرایمر گاو.

شکل۳: کروموزوم‌های دسته بندی شده در یک سلول ٤٤ کروموزومی BHK-21C5



M 1 2 3 4 5 6

شکل ٤: الکتروفورز محصولاتPCR برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز یک (CO1) سلول‌های مختلف (شاهد مثبت)
ستون ۱: سلول شاهد PAE با پرایمر خوک 460bp، ستون ۲ : سلول RBK با پرایمر گاو 102bp، ستون ۳: سلول LK با پرایمر گوسفند 267bp ، ستون ٤: سلول Vero با پرایمر میمون 222bp، ستون ٥ : سلول MRC5 با پرایمر انسان 391bp ، ستون ٦: سلول لنفوسیت بز با پرایمر بز 117bp

بررسی هویت سلول با تکثیر ژن اختصاصی گونه توسط PCR

الکتروفورز محصولات PCR (شکل ۳) نشان می دهد DNA استخراج شده از سلول BHK تنها با پرایمر طراحی شده گونه هامستر تکثیر شد که در مقایسه با مارکر، طول قطعه تکثیر یافته در حدود ۳۱٥ جفت باز تعیین شد(ستون ۱). همچنین، از DNA استخراج شده سلول BHK در کنار پرایمر پنج گونه سلولی دیگر در چاهک‌های مشخص شده هیچ گونه باندی مشاهده نشد(ستون ۳ تا ۷ شکل ۳). علاوه بر این، الکتروفورز محصولات PCR سلول‌های مختلف (شاهد مثبت) مطابق شکل٤ نشان داده شد. DNA استخراج شده هر یک از سلول‌ها با پرایمرهای اختصاصی خود، باند با سایز قابل انتظار نشان داده است(ستون ۱ تا ٦).

بررسی آلودگی بذر سلول مادر به ویروس‌های ناخواسته

با انجام روش‌های ذکر شده هیچ گونه آلودگی در بذر سلول مادر دیده نشد.

آزمایش تومورزایی

با سلول BHK مورد آزمایش در موش‌های تلقیح شده، هیچ گونه اثری از تشکیل ندول چه در محل تزریق و چه پس از کالبدگشایی موش‌ها مشاهده نشد. در مورد موش‌های کنترل مثبت بیش از ۹۰ درصد موش‌ها دارای ندول در محل تزریق بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

امروزه واکسن‌هایی بر پایه کشت سلول از لاین‌های سلولی پستانداران توسعه پیدا کرده‌اند. پتانسیل استفاده از کشت سلول در توسعه واکسن‌های ویروسی در سال‌های اخیر می‌تواند به عنوان یک برنامه مکمل و جایگزین استفاده از سایر استراتژی‌ها به کار گرفته شود. از مزیت‌های اصلی استفاده از لاین‌های سلولی می‌توان به تولید سریع واکسن در طی بیماری‌های همه گیر و امکان فرآوری واکسن‌های ویروسی متعدد در شرایط و امکانات مشابه و در محیطی استریل اشاره کرد. سلول BHK از سلول های بسیار مناسب برای رشد و تکثیر بسیاری از ویروس های بیماریزای انسانی و دامی در دنیا مطرح می باشد.[۱۷-۲۰] اما نکته ای که استفاده گسترده از این سلول را در ایران محدود می کند، عدم بررسی مناسب این سلول می باشد. اما در دنیا مطالعات مختلفی بر روی این سلول انجام شده است. Pindak و همکاران در سال ۱۹۶۹، روی تکثیر MM ویروس در لاین‌های سلولی پیوسته مطالعاتی انجام دادند که BHK-21 از لاین‌های مناسب برای جداسازی آلودگی ویروس MM از بافت مغز موش آلوده بود و سازگاری ویروس با انجام پاساژهای سریالی که با افزایش ضایعات سلولی و افزایش تیتر ویروس مشخص شد.[۲۱] Langelier و همکاران در سال ۱۹۸۱، روی خصوصیات ریبونوکلئاز ردوکتاز القایی در لاین سلولی BHK-21(C-13) با ویروس HSV پژوهشی انجام دادند که نتایج تغییر در بیان ویروس را نشان داد.[۲۲] J. Rudd و همکاران در سال ۱۹۸۷، حساسیت لاین سلولی BHK-21 و لاین سلولی نوروبلاستوما مورین در جداسازی یک گونه خیابانی ویروس هاری را مورد مقایسه قرار دادندکه نتایج نشان از حساسیت بیشتر لاین سلولی نوروبلاستوما مورین داشت.[۲۳] Linz و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی استوکیومتری، سینتیک و تنظیم متابولیسم گلوکز و آمینواسید لاین سلولی BHK نوترکیب مطالعه‌ای انجام دادند که تفاوت قابل توجهی در حساسیت مواد مغذی، استوکیومتری و متابولیسم آمینواسیدها در سطوح پایین مواد مغذی مشاهده شد.[۲۴] Sreck و همکاران در سال ۲۰۰۸، از فاکتور رشد پروسین برای آزمایش خصوصیات رشد تکثیری بر روی لاین سلولی BHK (C-13) در شرایط آزمایشگاهی استفاده کردند که سبب تسریع تکثیر و کاهش نیاز به سرم و دوره کشت لاین سلولی شد.[۲۵] در سال ۲۰۰۸، Sekar و همکاران مقایسه‌ای بر روی ویروس BTV انجام داده اند. شواهد به دست آمده براساس تیتر ویروس نشان از سازگاری گسترده ویروس با لاین سلولی BHK-21 و استقرار آن به عنوان یک لاین سلول هدف جهت تولید واکسن BTV داشت.[۲۶] Ferna´ndez-Nu´n˜ez و همکاران در سال ۲۰۱۵، روی بیان گلیکوپروتئین‌های ویروس هاری بر روی سوسپاسیون کشت شده از سلول BHK-21 کار کردند و مشخص شد که کاهش دما بعد از آلودگی سلولی برای بیان گلیکوپروتئین‌ها مفید خواهد بود.[۲۷] Singh و همکاران در سال ۲۰۱۵ به استانداردسازی آزمون خنثی‌سازی سرم از ویروس آنسفالیت ژاپنی بر روی BHK-21 (Cl-13) پرداختند که غلظت سلولی $۱/۵\times۱۰^{۴}$ جهت تشکیل مونولایر BHK در نظر گرفته شد. همچنین آزمایش خنثی‌سازی سرم(SNT) با استفاده از این لاین سلولی، به عنوان یک آزمایش جایگزین تست توانمندی واکسن معرفی شد.[۲۸] Mohammad Showkat Mahmud و همکاران در سال ۲۰۱۷، سازگاری سروتایپ‌های(O,A,Asia۱) ویروس تب برفکی روی لاین سلولی BHK–21 را مورد مطالعه قرار دادند. ضایعات سلولی ویروس روی این لاین سلولی، با گرد شدن و صاف شدن سلول‌ها، تشکیل سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای، شکست پل‌های بین سلولی و در نهایت مرگ سلول نشان داده شد.[۷] در سال ۲۰۱۸، ZOU و همکاران روی ترکیب mRNA سلول میزبان با ژنوم ویروس تب‌برفکی در کشت سوسپانسیون کار کردند. در این مطالعه ویروس تب‌برفکی سروتایپ Asia -1 به صورت سریالی روی مونولایر سلول BHK و بعد روی سوسپانسیون بدون سرم BHK برای تولید بذر ویروس جهت تولید واکسن‌های غیرفعال سازگاری یافت. منحنی رشد ویروس در مقایسه با گونه مادری سریع‌تر به میزان ماکزیمم رسید.[۲۹] Nikolay و همکاران در سال ۲۰۱۸، بر روی تکثیر گونه‌های ویروس زیکا برزیلی بر روی کشت سوسپانسیون و مونولایر سلول‌های BHK مطالعه کردند، کشت در بیوراکتورها با غلظت سلولی $۱/۲\times۱۰^{۷}$ cells/mL و با تیتر ویروسی PFU/mL $۳/۹\times۱۰^{۷}$ انجام شد. نتایج نشان از افزایش تعدادکل ذرات ویروسی و بازده سلولی (۳/۳ PFU/cell) کمتر از حد تعیین شده نسبت به سلول‌های چسبنده داشت.[۳۰] با توجه به مطالعات مذکور و اهمیت سلول BHK-21 در تولید و کنترل کیفیت فراورده‌های بیولوژیک و

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین مطالعات تحقیقاتی و تشخیصی انواع ویروس‌ها، در مطالعه حاضر سعی شد که با تعیین خصوصیات لاین سلولی BHK موجود در ایران و تهیه شناسنامه برای آن، بتوان از این لاین سلولی در تولید و تحقیق استفاده نمود. لذا ابتدا لاین سلولی از جهت خصوصیات رشد سلول ازجمله درصد بقا، موفولوژی سلول، زمان دو برابر شدن سلول و ضریب μ، هموژنیسیتی و میزان رشد سلول‌ها مورد بررسی قرارگرفت. سپس بذر سلول مادر و کاری از نظر آلودگی‌های باکتریایی، قارچی، مایکوپلاسمایی و مایکوباکتریومی مورد آزمایش قرار گرفت. با استفاده از کاریوتایپینگ، تنوع کروموزومی در این لاین سلولی مورد بررسی گرفت. پس از آن با استفاده از روش مولکولی PCR هویت کلون BHK، در کنار ۵ گونه سلولی دیگر سنجیده و تایید گردید. همچنین بذر سلولی مادر از جهت وجود ویروس‌های ناخواسته، با استفاده از روش مستقیم از طریق ایجاد ضایعات سلولی (CPE) در طول دوره انکوباسیون کشت سلول و در روش غیرمستقیم با جذب گلبول‌های قرمز خوکچه هندی و یا جوجه توسط بستر سلولی و همچنین با تزریق به تخم مرغ جنین دار و تزریق به موش بالغ و شیرخوار مورد ارزیابی قرار گرفت. علاوه بر این به منظور استفاده از این لاین سلولی در فرایند تولید از آزمایش تومورزایی به وسیله‌ی تلقیح به موش‌ها جهت بررسی بیان فنوتیپ تومورزا بهره گرفته شد. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که سلول مورد مطالعه فاقد خاصیت تومورزایی بوده و برای تولید فراورده بیولوژیک مناسب می‌باشد.

سپس با استفاده از PCR امکان آلودگی به برخی ویروس های خاص همچون BVD و BLV مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نتایجی که از آزمایشات مذکور مبنی بر مناسب بودن لاین سلولی BHK-21 به دست آمد امکان استفاده گسترده از این لاین سلولی به عنوان یک بستر مناسب برای تولید و کنترل کیفیت فراورده‌های بیولوژیک و در مطالعات تحقیقاتی و تشخیصی انواع بیماری‌ها وجود دارد.

نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از لاین‌های سلولی برای مطالعات تحقیقاتی، تشخیصی و همچنین تولید و کنترل کیفیت فراورده‌های بیولوژیک به ویژه واکسن‌ها اجتناب ناپذیر می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به رنج وسیع مطالعات ویروسی و همچنین واکسن‌های ویروسی، نیاز به استفاده از سلول‌های مختلف شناسنامه دار ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اهمیت لاین سلولی BHK در این مطالعات، استفاده از یک کلون مناسب و تحت کنترل از این سلول بسیار حائز اهمیت است. لذا در این مطالعه کلون سلولی مناسبی از این لاین سلولی تهیه شد و با تکنیک‌های مختلف سیتولوژی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل، این کلون سلولی را به عنوان سلول حساس برای مطالعات مختلف ویروس شناسی و واکسینولوژی معرفی می‌نماید و با توجه حساسیت مناسب این سلول نسبت به طیف وسیعی از ویروس ها، می تواند به طور گسترده مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه با عنوان " مطالعه خصوصیات رده سلولی BHK و معرفی آن به عنوان سلول حساس ویروس سرخجه " در مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی در سال ۱۳۹۷ می‌باشد که با حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی اجرا شده است (کد: ۳۹۱۶۱).

References

1. Mc Keehan WL, Barnes D, Reid L, Stanbridge E, Murakami H, Sato GH. Frontiers in mammalian cells culture. In vitro cellular & developmental biology 1990;26(1):9-23.
2. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications: John Wiley & Sons; 2015.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. Molecular Biology of the Cell 4th Edition: International Student Edition. Routledge; 2002.
4. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. The serum-free media interactive online database. ALTEX-Alternatives to animal experimentation. 2010;27(1):53-62.
5. Fernandes IR, Russo FB, Pignatari GC, Evangelinellis M, Tavolari S, Muotri AR, et al. Fibroblast sources: Where can we get them? Cytotechnology 2016;68(2):223-8.
6. Hernandez R, Brown DT. Growth and maintenance of

www.SID.ir

Archive of SID

baby hamster kidney (BHK) cells. Current protocols in microbiology 2010;17(1):A. 4H. 1-A. 4H. 7.

7. Mahmud MS, Islam E, Samad MA, Karim MR, Saha AK, Giasuddin M. Adaptation of Three Different BLRI Strain (O, A, Asia 1) of Foot and Mouth Disease Virus Serotypes in Baby Hamster Kidney-21 Cell Line. Immunology and Infectious Diseases 2017;5(2):11-5.
8. Perrin P, Madhusudana S, Gontier-Jallet C, Petres S, Tordo N, Merten O-W. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. Vaccine 1995;13(13):1244-50.
9. Brill G, Vaisman N, Neufeld G, Kalcheim C. BHK-21-derived cell lines that produce basic fibroblast growth factor, but not parental BHK-21 cells, initiate neuronal differentiation of neural crest progenitors. Development 1992;115(4):1059-69.
10. Susan S, Ya S, Mm E-H. Preparation and Evaluation of Master Seed for infectious bronchitis vaccine from local variant isolate. Nat Sci. 2011;9:145-50.
11. Worton RG, Duff C. [27] Karyotyping. Methods in enzymology. 58: Elsevier; 1979. p. 322-44.
12. Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R, et al. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 2007;43(10):344-51.
13. Schochetman G, Ou C-Y, Jones WK. Polymerase chain reaction. The Journal of infectious diseases 1988;158(6):1154-7.
14. Specter SC, Hodinka RL, Wiedbrauk DL, Young SA. Clinical virology manual: American Society for Microbiology Press; 2009.
15. Organization WH. Expert committee on biological standardization. Geneva, 19 to 23 October 2009. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs) 2009.
16. Kuzmin IV. Virus Isolation in Animals: The Mouse Inoculation Test. Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2: Elsevier; 2015. p. 13-23.
17. A.-C. Bachoud-Lévi ND, J.-P. Nguyen, J. Bloch, C. Bourdet, L. Winkel, P. Rémy, M. Goddard, J.-P. Lefaucheur, P. Brugières, S. Baudic, P. Cesaro, M. Peschanski, and P. Aebischer. Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease Using a Polymer Encapsulated BHK Cell Line Engineered to Secrete Human CNTF. Human Gene Therapy 2004;11(12):12-8.
18. Deckwer MLAPZRWWD. Stoichiometry, Kinetics, and Regulation of Glucose and Amino Acid Metabolism of a Recombinant BHK Cell Line in Batch and Continuous Cultures. Biotechnology Pogress 1997;13(4):453-63.
19. Hu KCJAYNVNMJKPJCTGGKWS. Exploring the transcriptome space of a recombinant BHK cell line through next generation sequencing. Biotechnology and Bioengineering 2014;111(4):770-81.
20. Buttin YLaG. Characterization of Ribonucleotide Reductase Induction in BHK-21/C13 Syrian Hamster Cell Line Upon Infection by Herpes Simplex Virus (HSV). JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY 1981;57(1):21-31.
21. Pindak FF, Schmidt JP. Propagation of MM virus in continuous cell lines. Appl Environ Microbiol. 1969;17(6):815-8.
22. Langelier Y, Buttin G. Characterization of ribonucleotide reductase induction in BHK-21/C13 Syrian hamster cell line upon infection by herpes simplex virus (HSV). Journal of general virology 1981;57(1):21-31.
23. Rudd RJ, Trimarchi CV. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. Journal of clinical microbiology 1987;25(8):1456-8.
24. Linz M, Zeng AP, Wagner R, Deckwer WD. Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. Biotechnology progress 1997;13(4):453-63.
25. Srček VG, Radošević K, Kniewald H, Slivac I, Kmetič I, Kniewald Z. Effect of porcine brain growth factor on primary cell cultures and BHK-21 [C-13] cell line. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal 2009;45(1-2):28.
26. Sekar P, Ponmurugan K, Gurusubramanian G. Comparative Susceptibility of BHK 21 and Vero Cell Lines to Bluetongue Virus (BTV) Isolate Pathogenic for Sheep. Internet J Microbiol. 2009;7(1):1-5.
27. Fernández-Núñez EG, De Rezende AG, Puglia ALP, Leme J, Boldorini VLL, Caricati CP, et al. Transient expression of rabies virus G-glycoprotein using BHK-21 cells cultured in suspension. Biotechnology letters 2015;37(6):1153-63.
28. Singh S, Sharma M, Kumar S, Gowal D. Standardization of serum neutralization assay of Japanese encephalitis virus (Nakayama NIH strain) on BHK-21 (Cl-13) cell line. Acta virologica 2015;59(3):234-9.
29. Zou X, Zhu Y, Bao H, Guo X, Sun P, Liu Z, et al. Recombination of host cell mRNA with the Asia 1 foot-and-mouth disease virus genome in cell suspension culture. Archives of virology 2018:1-10.
30. Nikolay A, Castilho LR, Reichl U, Genzel Y. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. Vaccine 2018;36(22):3140-5.

www.SID.ir

Archive of SID

AUMJ Alborz University of Medical Sciences Journal

Alborz University of Medical Sciences Journal, October 2020, Vol. 9, No. 4: 405-414 *Original Article*

Characterization of the BHK-21C5 Cell line and Its Introduction for use in Research, Diagnostics and Production of Biological Products

Fereshteh Ziaiifar[1], Sina Soleimani[2*], Mohsen Lotfi[3]

[1] *Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

[2] *Department of Bio bank, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran*

[3] *Department of Viral Vaccine Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), P.O. Karaj, Iran*

***Corresponding Author:**
Department of Bio bank, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Tel: 09121778103
E-mail: s.soleimani@rvsri.ac.ir

Received:12 Oct. 2019; Accepted: 13 May 2020

Abstract

Background and Objectives: Several studies have been carried out on the use of cell lines in researches, production and processing of drugs and biological products, and on the identification of toxicity and efficacy.The present study was conducted to determine the characteristics of BHK-21 cell lines as a suitable substrate for use in vaccine production and quality control, viral culture and research and diagnostic studies.

Materials and Methods: In this study cloning of the cells by limit dilution was performed by preparing the appropriate seed cells. After checking the cell growth characteristics, sterility tests performed to ensure the absence of bacterial, fungal, mycoplasma, and mycobacterial infections. Detection of chromosomal diversity by karyotyping and cell identity using molecular tests along the CHO,LK,RBK,MRC5,Vero,GL cell lines was done. Also, master cell seed was tested for detection of adventitious viruses in two methods: in direct way through cytopathic effect during incubation of cell cultures and in indirect method using hemadsorption test, inculation into embryonic eggs, injection into mature and newborn mice.

Results: The results indicated, this cell line had suitable growth charestristics without cross contaminations. Also the cell identity was confirmed by karyotyping and molecular tests.

Conclusion: The results of various tests indicated that this cell line has the necessary requirements for use in the production and quality control of the biological products and viral researches.

Keywords: BHK cell line, Karyotyping, Vaccine, Master cell seed, Characterization

www.SID.ir