الفصل الثاني والأربعون

طرق زراعة الخلية
CELL–CULTURE METHODS

كاريل أ. شات، وهـ . غراهام بورتشاس
Karel A. Schat and H. Graham Purchase

Summary الملخص

تستخدم مزارع الخلية تقليدياً للعزل والتعرف وتنمية الفيروسات. يتطلب الاستخدام الناجح لمزارع الخلية لتقنيات مناسبة لتجهيز وتعقيم الأدوات الزجاجية. تستخدم العديد من أنواع تكوينات الأوساط لنمو الخلايا خارج الجسم الحي. في هذا الفصل تم الوصف المفصل لتقنيات تجهيز وحفظ المزارع الأولية والثانوية باستخدام الخلايا الليفية لأجنة بيض الدجاج وخلايا كلى الدجاج وخلايا كلى أجنة الدجاج والخلايا الليمفاوية، بالإضافة إلى شرح مختصر لتجهيز خلايا أوتار أجنة الدجاج والخلايا الطلائية المعوية. يناقش في هذا الفصل تطبيق مزارع الخلية للفحوصات الفيروسية.

Introduction المقدمة

تستخدم مزارع الخلية تقليدياً في المعامل التشخيصية للعزل والتعرف وإكثار الفيروسات والكوكسيديا ولكشف الأجسام المضادة المعادلة للفيروس. مزارع الخلية لها عدة ميزات عن الحيوانات وأجنة البيض المستخدمة لمثل هذه الأغراض، وهي اقتصادية ونوع الخلايا بها متجانس نسبياً وخالي من التأثيرات المناعية والهرمونية التي قد تؤثر على تكاثر الفيروس. يمكن أن تحفظ الأنواع المتعددة من الخلايا في النيتروجين السائل ومن ثم تتوافر بسهولة، بالإضافة إلى الميزات الحديثة في الاستنساخ وتتابع الأحماض النووية وتعبير الناقلات الخلوية في الطيور وعوامل النمو مما يتيح تطوير مزارع الخلية باستخدام أنواع خلوية متخصصة والتي لا يمكن أن تنمو باستعمال الطرق المعتادة. استخدام الخامات الخالية من المسببات المرضية يكون أساسياً للتنمية الناجحة للخلايا والاستعمال التالي لعزل الفيروس. أحياناً قد يستخدم البيض غير الخالي من المسببات المرضية لزراعة الخلية لوسائل العزل الفيروسي المباشر.

يدخل عدد كبير من العمليات المتلاحقة في زراعة الخلية لأن تقنيات التعقيم تكون غاية في الأهمية حتى في وجود المضادات الحيوية. يمكن أن تخفض أخطار التلوث بشدة باستخدام كبائن الزرع المعقمة. حتى هذه يمكن عمل زراعة الخلية بصورة مرضية أو كافية في غرفة نظيفة جيدة الإضاءة حيث تتضائل الأتربة والتيارات الهوائية. تعتبر التقنية المعقمة والسرعة ومهارة الفني عوامل مهمة جداً تحت هذه الظروف، ويعطي Freshney (4) و Versteeg (7) معلومات إضافية على مزارع الخلية.

أدوات المعمل Laboratory Equipment

في حالة ضرورة تحضير أوساط ومحاليل المزرعة في المعمل في أدوات زجاجية يعاد استعمالها فإنه يجب توافر مصدر كبير للماء النقي. يجب أن يكون الماء خالياً من الأيونات مزدوجة التقطير أو كلاهما لإزالة كل بقايا المواد العضوية وغير العضوية السامة للخلية. يستعمل عادة الضغط الأسموزي العكسي reverse osmosis (RO) ويتبعه التقطير الزجاجي. يجب حفظ الماء النقي ونقله في أواني زجاجية أو مبطنة بالزجاج.

عموماً تزرع الخلايا في أطباق بتري زجاجية أو قوارير أو زجاجات أسطوانية خاصة المبطنة لمزرعة الخلية. لا يمكن استخدام الأطباق البلاستيكية المعدة للاستخدام البكتيريولوجي لمزارع الخلية. تعقم الأوعية البلاستيكية بعد الاستخدام بالأوتوكلاف وتستبعد، ومن المحتمل إعادة تصنيع البلاستيك المستخدم بالطريقة التالية:

١) عقم البلاستيكيات المستخدمة لمدة ١٦ ساعة في ٢٪ هيبوكلورايت الصوديوم أو في فرن ميكروويف لمدة ١٠ دقائق.
٢) اغسل ست مرات على الأقل في ماء الصنبور.
٣) صفِّ واغسل ست مرات في ماء مقطر.
٤) صفِّ وجفف في حضان عند ٤٨ °م.
٥) عقم الخامات البلاستيكية في فرن ميكروويف منزلي (٢,٤٥ ميجاهيرتز) لمدة ٣ – ٦ دقائق. ضع الكأس مع ٢٥٠ – ٥٠٠ مل من الماء في فرن كمغطس حراري. من المهم تبريد الفرن بين المرات وأن تحفظ البلاستيكيات جافة. يمكن أن تكدس أطباق بتري لثلاث أدوار ويجب وضع القوارير معتدلة مع أغطية سائبة. قد يفضل تعقيم الأغطية منفصلة اعتماداً على جهة صناعة القوارير. تسمح هذه الطريقة باستعمال خامات مزرعة الخلية البلاستيكية ١٠ – ٣٠ مرة قبل أن تبدأ في التدهور.

على الرغم أن الأدوات الزجاجية تم إحلالها كثيراً بالبلاستيكيات، إلا أنه يمكن استعمال الأدوات الزجاجية لتنمية الخلايا لكن يكون الغسيل الجيد أساسياً. الطريقة العامة التالية يوصى بها في تحضير كل الأدوات الزجاجية المستعملة في مزرعة الخلية.

١) طهر كل الخامات الملوثة بالأوتوكلاف عند ٢٠ رطلاً لكل بوصة مربعة لمدة ٢٠ دقيقة.

٢) اغسل في ماء الصنبور لإزالة المواد الصلبة، عند الضرورة استخدم الفرشة. الأواني الزجاجية الجديدة (اختيارياً) أو الأواني الزجاجية شديدة التلوث يجب أن تغمر لمدة ١٢ ساعة في محلول تنظيف من حمض الكبريتيك ثنائي الكرومات. (أذب ١٢٠ جم من ثنائي كرومات الصوديوم في لتر ماء صنبور وأضف ١٦٠٠ مل من حمض الكبريتيك المركز. ضع الإناء في الماء المثلج البارد أثناء التحضير واستعمل زجاجيات آمنة وقفازات سميكة). يمكن أن تعالج السدادات المطاطية في هيدروكسيد الصوديوم ٠,٥ عياري.

٣) انقع الأجزاء الصغيرة في ماء ساخن بواقع ٧٥ مل لكل أربعة لترات من الماء لمدة ساعة على الأقل من Micro® (International Products Corp., Burlington, N.J.). ضع الزجاجات والقوارير والأجزاء الكبيرة الأخرى في ماء دافئ (٥٢°م) في غسالة الزجاجيات التي تعمل بالموجات فوق الصوتية Micro®. ضع الماصات في حوامل بعد إزالة السدادات القطنية وضعها في غسالة زجاجيات كما تم سابقاً. يمكن أن تستبدل Micro® بالمطهرات القاعدية الأخرى التي لا تدمص على الزجاج.

٤) اشطف مرتين على الأقل بماء الصنبور ومرتين في الأسموزية العكسية أو الماء المزدوج التقطير. اغسل الماصات في شاطفات الماء البارد لثماني مرات على الأقل بماء الصنبور وتغمر بعد ذلك في الماء الأسموزي العكسي.

٥) اصرف الماء من كل الزجاجيات على أرفف أو في فرن تجفيف.

٦) ضع سدادات في الماصات ثم توضع في علبة معدنية وتعقم بالحرارة الجافة عند ١٦٠°م لمدة ساعتين بعد وصول الفرن لدرجة الحرارة المذكورة. لف الأجزاء الصغيرة وعبئها. يمكن أن تعقم الخامات التي تذوب أو تحترق بالأوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة. يوصى باستعمال الشريط الكاشف أو الأمبولات للتأكد من الحرارة المناسبة.

بالإضافة للزجاجيات المعتادة والأدوات التي توجد في معمل البكتيريولوجي، فإن المعدات الضرورية التي تشمل المجهر المقلوب وفي حالة زراعة الخلايا في أطباق أو أنابيب تفتح في الجو يجب توافر حضان توفر ٨٥٪ رطوبة نسبية و٣ — ٥٪ ثاني أكسيد الكربون. من المهم تنظيف الحضانات لمنع التلوث الظاهري لمناطق العمل والتي تلوث المزارع. يوصى بالتطهير الروتيني للحضان بسبب الرطوبة النسبية التي تشجع نمو الفطريات. لا يقبل المص عن طريق الفم ويستخدم إما المرشح الماصي المطاطي أو جهاز ماص كهربائي.

أوساط مزرعة الخلية والمحاليل المركزة Cell-Culture Media and Stock Solutions

يمكن أن تستخدم العديد منها وتتكون جميعها من التركيب الأساسي التالي:

١) محلول ملح متزن.

٢) مصدر بروتين مثل المصل أو سوائل الأمنيون أو مشتقات بروتين مثل لاكتوز الزلال المتحلل أو شوربة فوسفات التربتوز أو أحماض أمينية.

٣) خليط مضادات حيوية للسيطرة على التلوث الميكروبي المفاجئ، إلا أن استخدام المضادات الحيوية ممنوع في خطوط الخلايا المستديمة لأنها قد تخفي المستوى المنخفض.

بالرغم من إمكانية شراء العديد من الأوساط تجارياً إلا أنه أحياناً يكون من السهل أو الضروري أن تحضر هذه المكونات بالإمكانيات المتاحة. من الأفضل استخدام ماء نقي وخامات خاصة لمزرعة الخلية.

محاليل الملح المتزنة ومحلول ملح الفوسفات المنظم
Balanced Salt Solutions (BSSs) and Phosphate-Buffered Saline (PBS)

محلول ملح المتزن هانك BSS Hank's (HBSS) وإيرلي Earle's (EBSS) هما الأكثر تكراراً في الاستخدام كأساسات لأوساط النمو (الجدول رقم ٤٢,١)، ووظيفتهما هي الحفاظ على درجة الأس الهيدروجيني الفسيولوجية (٧,٢ – ٧,٦) والضغط الأسموزي والإمداد بالماء والجلوكوز والأيونات غير العضوية المطلوبة لنشاط الأيض للخلية الطبيعية. تستخدم أيضاً غالباً لغسل الطعوم والخلايا الميتة من المزارع وذلك لإزالة الأوساط المحتوية على المصل قبل عملية الهضم بالتربسين ولتخفيف محاليل التربسين، إلا أنه عند استخدام الفيرسين (إديتا) كمعلق للخلايا فإن محلول ملح دلبيكو Dulbecco's BBS بدون أملاح الكالسيوم والمغنسيوم (محلول A (الجدول رقم ٤٢,١) يكون حتى لتر من الماء) يجب أن يستخدم لغسل الخلايا ولتخفيف الفيرسين.

عند إتمام تحضير المحاليل يجب أن يذاب كل ملح تماماً قبل إضافة الملح الآخر. الأفضل عند تحضير المحاليل المركزة A و B من هانك وإيرلي (الجدول رقم ٤٢,١) أن تكون مركزة ١٠ مرات ويمكن أن تعقم بالأوتوكلاف منفصلة وتبرد بعد ذلك وتخلط ببطء مع التقليب الثابت. البديل أنه يمكن أن تخلط كالسابق وتعقم بالترشيح وتحفظ مجمدة أو عند ٤ °م. للاستخدام يضاف جزء من محلول مركز ١٠ مرات إلى ٩ أجزاء من الماء ويعقم المحلول في النهاية إما بالترشيح أو بالأوتوكلاف. ينصح بإزالة الفينول الأحمر عند استخدام محاليل بي بي إس BBS و بي إس إس BSS في تحضير الخامات للصبغ المناعي الكيميائي النسيجي أو للبيولوجيا الجزيئية.

الجدول رقم (٤٢,١). المكونات لتحضير تركيز 1x من BSS و PBS.

المحلول	المكون[A]	الكمية[B]			
		PBS	Dulbecco's BSS	Earle's BSS	Hank's BSS
A	ماء	٨٠٠	٨٠٠	٨٠٠	١٠٠
	كلوريد صوديوم	٨	٦,٨	٨	٨
	كلوريد بوتاسيوم	٠,٤	٠,٤	٠,٢	٠,٢
	سلفات ماغنسيوم	٠,٢	٠,٢	–	–
	فوسفات بوتاسيوم	٠,٠٦	–	٠,٢	٠,٢٦
	$Na_2HPO_4.2H_2O$	٠,٠٦	–	٠,١٤	٠,٥٧
	$NaH_2PO_4.H_2O$	–	٠,١٤	–	–
	جلوكوز	١	١	–	–
	فينول أحمر صوديوم	٠,١٧	٠,١٧	٠,١٧	٠,١٧
B	ماء	١٠٠	١٠٠	١٠٠	–
	كلوريد كالسيوم	٠,١٤	٠,٢	٠,١	–
C	ماء	١٠٠	١٠٠	١٠٠	–
	كلوريد ماغنسيوم	–	–	١	١,٨[C]
	$NaHCO_3$	٠,٣٥	٢,٢	–	–

[A] أضف محلول A إلى محلول B. عقم المحاليل A و B و C بالأوتوكلاف لمدة ١٠ دقائق. محلول C يمكن أن يعقم بالترشيح الضاغط. بعد التبريد يمكن خلط محاليل A و B و C. احذف محاليل B و C عند عدم الاحتياج لهذه المكونات. في هذه الحالة أضف ٢٠٠ مل من الماء إلى محلول A.

[B] كل الكميات بالجرام فيما عدا الماء فيكون بالميلليتر. استخدم ماء أقل من الموضح. بعد إضافة كل المكونات إلى المحلول أضف الماء للكمية المطلوبة. للمحاليل 10x استعمال الكميات بتركيز 10x فيما عدا الماء، يحذف محلول C من محاليل Hank و 10x Earle.

[C] أضف مباشرة إلى محلول A.

محلول التربسين والفيرسين Trypsin and Versene (TV) Solution

يمكن تحضير المحاليل المركزة حتى ٢,٥٪ للتربسين أو يحصل عليها تجارياً. تستخدم غالباً المحاليل التالية المركزة ١٠ مرات للتربسين والفيرسين لمزارع خلية الطيور والتي تحضر كالتالي. أذب لتراً من الماء المقطر زجاجياً بالترتيب التالي: ٨٥ جم كلوريد الصوديوم، و٠,٤ جم كلوريد البوتاسيوم، و١٠ جم جلوكوز، و٣,٥ جم $NaHCo_3$، و١٠[٦] وحدة من بنسللين ج صوديوم، و١ جم سلفات ستربتوميسين (انظر أعلى)، و٥ جرام تربسين ١ : ٢٥٠ (GIBCO-BRL)، و٢,٥ جم إديتا، و٢٠ مل من ٠,٥٪ محلول الفينول الأحمر (GIBCO-BRL). قلب لمدة

٢ – ٣ ساعات عند درجة حرارة الغرفة أو طوال الليل عند ٤ °م. لا يذوب كل التربسين في المحلول. الأجزاء غير الذائبة يمكن إزالتها بالطرد المركزي عند ١٨٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة أو بالترشيح خلال ١ – ٢,٥ سم Celite filter aid على قمع بوخنر Buchner. عقم المحلول (TV) بالترشيح. وزع إلى كميات ٥٠ – ١٠٠ مل وجمد عند –٢٠ °م. يستعمل المحلول (1x) (التركيزات النهائية : ٠,٠٥٪ تربسين و٠,٠٢٥٪ فيرسين) يخلط ١٠٠ مل من محلول 10x TV مع ٩٠٠ مل من ماء مقطر زجاجياً ومعقم. دفِّئ المحلول حتى ٣٧ °م قبل الاستعمال.

محلول بيكربونات الصوديوم Sodium Bicarbonate

لتسهيل التحكم في درجة الأس الهيدروجيني، يحذف غالباً بيكربونات الصوديوم من محاليل الملح والأوساط ويضاف إلى الوسط قبل الاستعمال مباشرة. تستعمل التركيزات المختلفة من ١,٤٪ حتى ١٠٪. يستعمل محلول ١٠٪ في ماء مزدوج التقطير أو الماء المقطر عكسياً ويعقم بالترشيح تحت ضغط موجب يحول الأوتوكلاف (انظر الجدول رقم ٤٢.١) أو الترشيح تحت ضغط سالب بيكربونات الصوديوم إلى كربونات الصوديوم. الوسيلة البديلة باستخدام تركيزات متكافئة الجزيئات من كربونات صوديوم وبيكربونات صوديوم. احفظ عند درجة الغرفة في كميات صغيرة في أنابيب محكمة الغلق.

محلول المتعادل الأحمر Neutral Red Solution

يحضر محلول ١٪ من المتعادل الأحمر (GIBCO-BRL) في الماء ويعقم بالترشيح ويحفظ عند درجة الغرفة. يتوافر تجارياً محلول ٣٣٪ من GIBCO-BRL.

محلول المضاد الحيوي Antibiotic Solution

تتوافر تجارياً محاليل المضاد الحيوي–المضاد الفطري من GIBCO-BRL. تحتوي هذه المحاليل على ١٠٠٠٠ وحدة دولية/مل من بنسيللين ج صوديوم، و١٠٠٠٠ميكروجرام/مل من سلفات ستربتوميسين، و٢٥ ميكروجرام/مل من أمفوتريسين B (Fungizone®, Bristol-Myers Squibb Co., Princeton, N.J.) في محلول ملح. أضف ١ مل من هذا المحلول إلى ١٠٠ مل من الوسط. عند صعوبة الحصول عليها تجارياً فيمكن أن تحضر ذاتياً. في مثل هذه الحالة تذاب عبوات بنسللين ج صوديوم وسلفات داي هيدروستريتومايسين في الماء المقطر أو PBS لتوفر ١٠٠٠٠ وحدة و١٠٠٠٠ ميكروجرام على التوالي لكل ملليتر من المحلول المركز ويراعى أن تفتح العبوات بشكل معقم. يمكن أن تعقم بالترشيح في حالة عدم المعاملة بطريقة معقمة. يمكن أن يضاف أمفوتيرسين B أو فنجيزوين بمعدل ٢٥ ميكروجرام/مل. أمفوتيرسين غير ذائب ويجب أن يضاف بطريقة معقمة. يجب أن يحفظ المخلوط في أحجام مقننة

ويجمد، وللاستخدام يذاب ويضاف لكل الأوساط والمحاليل المستخدمة في مزرعة الخلية بمعدل ١ مل من المحلول المركز للمضادات الحيوية لكل ١٠٠ مل من الوسط. هذا يوفر تركيز نهائي ١٠٠ وحدة من البنسللين و١٠٠ ميكروجرام من ستربتوميسين و٠,٢٥ ميكروجرام من أمفوتريسين لكل ملليتر من الوسط. أحياناً تستخدم تركيزات أعلى. المحاليل المركزة من المضادات الحيوية لا يجب أن يكرر تجميدها وإذابتها. البديل للبنسللين ستربتوميسين هو سلفات جنتاميسين بمعدل ١٠ ميللجرام/مل، واستعمل ٠,١ مل لكل ١٠٠ مل من الوسط. لا يوصى باستعمال المضادات الحيوية للسيطرة على الميكوبلازما. الاختبار الجيد للمصل (انظر أسفل) هو استعمال خامات خالية من الممرضات النوعية للحصول على مزرعة خلية واستعمال مساعد الماصة يمنع التلوث بميكوبلازما الثدييات والطيور والإنسان.

زلال اللاكتوز المتحلل Lactoalbumin Hydrolysate

تتوافر هذه البودرة تجارياً من Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. يحضر محلول زلال اللاكتوز عامة كتركيز 10x (٢,٥ وزن/ حجم) في محلول ملح هانك أو إيرلي بدون بيكربونات الصوديوم ويعقم بالأوتوكلاف ويحفظ عند درجة الغرفة. التركيزالنهائي في الوسط هو ١٠٪ من المحلول المركز أو ٠,٢٥٪ (وزن/حجم).

شوربة فوسفات التربتوز Tryptose Phosphate Broth (TPB)

تحضر شوربة فوسفات التربتوز (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) بإذابة ٢٩,٥ جم في لتر ماء، وتوزع وتعقم بالأوتوكلاف وتحفظ عند ٤°م أو درجات الغرفة. تستخدم كمكون للأوساط خاصة لتكوين بؤرة بفيروس Rous sarcoma. هي أيضاً مادة جيدة لضبط التعقيم البكتريولوجي: أضف ١ — ٢ مل من أوساط الاختبار إلى ٥ مل من شوربة التربتوز وحضن عند ٣٧°م لأكثر من أسبوع.

الآجار Agar

اعتماداً على استعمال محاليل ١,٦٪ – ٣٪ من الآجار البكتيري (GIBCO-BRL) يحضر في الماء. يذاب الآجار ويعقم بالأوتوكلاف لمدة ٢٠ دقيقة. بعد التبريد، يحفظ الآجار عند درجة الغرفة في أنابيب محكمة الغلق. مباشرة قبل الاستعمال يذاب الآجار في فرن ميكروويف أو بالغليان في حمام مائي وتترك حتى ٤٥°م في حمام مائي. محلول الآجار يجب أن لا يكرر إذابته وصلابته وهو مناسب لمعظم الاستخدامات، لكن تكاثر الفيروسات يتوقف بوجود عديد السكريات الكبريتية الأنيونية. إضافة ١٠٠ ميكروجرام من ثنائي إيثيل أمينو إيثيل الدكستران لكل ملليتر من وسط الآجار أو استعمال آجار نوبل أو آجاروز يقلل هذه المشكلة.

الأمصال Sera

يستعمل مصل أجنة الأبقار (FBS) ومصل العجول ومصل الدجاج على الأغلب في تحضيرات مزارع خلية الطيور، إلا أن الأمصال من أنواع أخرى يمكن أن تستخدم بنجاح. مصل أجنة الأبقار والعجول هي الأفضل تجارياً بينما مصل الدجاج يمكن شراؤه تجارياً لكن اختباره لوجود فيروسات الطيور ليس كافيا دائماً. اقترحت الطريقة التالية في حالة وجوب تحضير المصل من الدم:

١) اجمع الدم من الأفراد المختلفة من نفس النوع فردياً واتركه ليتجلط تلقائياً.

٢) حضن الدم المتجلط عند ٣٧°م لمدة ساعتين وبعدها يمكن أن يحفظ طول الليل في ٤°م.

٣) افصل المصل واطرد مركزياً عند ٢٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة لإزالة كرات الدم الحمراء.

٤) يمكن أن تجمع الأمصال الفردية لكن احفظ المجموعة منفصلة.

٥) يمكن أن يجمع المصل بطريقة معقمة أو يعقم بالترشيح على الرغم أنه يسد معظم المرشحات سريعاً (انظر الفقرة عن التعقيم).

يجب اختبار كل مجاميع الأمصال شاملة تلك المشتراة من مصادر تجارية لدعمها لنمو الخلية ولوجود الميكوبلازما. تعطى معظم مصادر الأمصال قارورة ١٠٠ مل من المصل من الكمية المشتراة لتسمح باختبارها قبل الشراء. الطريقة التالية معتمدة لاختبار دعم نمو الخلية:

١) جهز مزارع باستخدام 1x و 0.5x من العدد المنتظم من الخلايا.

٢) أجرِ تمريراً أو إعادة زرع عندما تكون المزارع مندمجة، ويفضل أن تتبع بإعادة زرع ثانوية. الفروق الكائنة بين مجاميع المصل قد لا تكون دليلاً حتى بعد التمريرة الثانوية. إنه من المهم اختبار مجاميع المصل على كل أنواع الخلايا المستخدمة.

يمكن أن يستخدم الوسط لأول دورة اختبار لاختبار الميكوبلازما (مزرعةالخلية تمثل تغذية ممتازة للميكوبلازما). تسمح الطريقة التالية باكتشاف معظم أنواع الميكوبلازما الملوثة الشائعة:

١) جهز وسط سائل (Fabricant's medium II) باستعمال شوربة heart-infusion broth (Difco) مزودة بمصل الخنازير ١٠٪، و١٠٪ مستخلص خميرة طازج (انظر أسفل)، و١٠٠٠ وحدة/مل من بنسللين ج صوديوم، و٠,١٪ خلات الثاليوم.

٢) تجهز الأطباق كالسابق لكن بإضافة آجار heart-infusion (Difco) بدلاً من الشوربة.

٣) احقن ٢ مل من العينة في أنبوبة مع ٢ مل من الوسط السائل.

٤) حضن لمدة ثلاثة أيام عند ٣٧°م، افرد ملء اللوب على مربع على الطبق، وحضن في إناء الشمعة مع جو رطب.

٥) افحص الطبق بعد ٦ أيام لوجود مستعمرات الميكوبلازما.

التحضير المناسب لمستخلص الخميرة يعتبر أساسياً ويجرى كالتالي :

١) سخن لتر من الماء حتى ٤٥ °م، وأضف ٢٥٠ جم خميرة مخبز حية، وقلب لمدة ١٥ دقيقة وبرد المعلق.

٢) اطرد مركزياً عند ١٦٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة.

٣) رشح الرائق خلال ورق ترشيح وعقم في الأوتوكلاف في زجاجات أو أنابيب.

٤) احفظ المستخلص عند —٢٠ °م حتى الحاجة للاستخدام.

بدلاً من استعمال هذه الطريقة، من الممكن أيضاً اختبار السوائل الرائقة باختبار تفاعل البلمرة المتسلسل باستخدام البوادئ المناسبة، لكن قد تفقد هذه الطريقة بعض أنواع الميكوبلازما.

مستخلص أجنة الدجاج Chicken Embryo Extract

يفضل أجنة دجاج خالية من الممرضات النوعية عمرها ٨ — ١٠ أيام. بعد التخلص من العيون، اهرس الأجنة ببعضها خلال محقن وإبرة مقاس ١٨ — ٢٠ في قارورة تحتوي على حجم مساوي من محلول ملح الفوسفات. يحفظ المعلق طوال الليل عند —٢٠ °م، ويذاب عند ذلك ويطرد مركزياً لمدة ١٥ دقيقة عند ٥٠٠ إكس جي واحفظ الرائق. يمكن أن تكرر هذه العملية مرتين. بعد الطرد المركزي النهائي، احفظ الرائق عند —٢٠ °م.

التعقيم Sterilization

العديد من المكونات وأحياناً الوسط الكامل يمكن أن تشترى معقمة. يمكن أن تعقم بعض المحاليل بالأوتوكلاف، على سبيل المثال محلول ملح الفوسفات والآجار ومحلول الفيرسين ومحلول الأحمر المتعادل وشوربة فوسفات التربتوز وزلال اللاكتوز المتحلل والماء المقطر، إلا أن الأوساط المحتوية على مكونات غير ثابتة حرارياً مثل الأحماض الأمينية أو المضادات الحيوية أو المصل أو التربسين لا يمكن تعقيمها بالأوتوكلاف ويجب أن تعقم بالترشيح. الترشيح الضاغط خلال مرشحات غشائية باتباع الطرق الموصى بها بواسطة المصنع (Millipore Corp., Bedford, Mass. or Gelman Sciences, Ann Arbor, Mich.). عادة يكون المرشح المفرد المعقم كافياً لترشيح محاليل غير المصل أو التربسين. يوصى بالمرشحات الخاصة وحوامل المرشح لترشيح منتجات المصل وهي متوفرة من (Gelman, Millipore).

أوساط المزرعة Culture Media

يجب أن تمد أوساط مزرعة الخلية الخلايا بالمغذيات الضرورية والظروف المناسبة للأيض الطبيعي. بعض الأوساط مثل M-199 و RPMI-1640 مركبة وتحتوي من ٥٠ — ١٠٠ مكوناً ويكون من الأفضل شراؤها

(إما على شكل مركز 10x أو على شكل بودرة). الأوساط الأبسط مثل محلول إيرلي (Earle's BSS) مع متحلل زلال اللاكتوز تكون سهلة التحضير في المعمل. اختيار الوسط والكمية ومصدر المصل المضافة إلى الوسط يعتمد على عدد من العوامل مثل احتياجات الخلية والاستخدام المحدد لمزارع الخلية وسعر وتوفر مكونات الأوساط والأمصال. تضاف الفيتامينات الإضافية والأحماض الأمينية (خاصة جلوتامين L) ومستخلص جنين الدجاج غالباً لتحسين النمو. إضافة ١٠٪ شوربة فوسفات التربتوز يسهل تحول الخلايا بواسطة فيروسات راوس ساركوما. الجدول رقم (٤٢,٢) يعطي أمثلة لتكوينات الأوساط المستعملة في العديد في معامل البحث.

يعطي الجدول رقم (٤٢,٣) المكونات لآجار التغطية. التركيز النهائي للآجار ٠,٨ – ١٪ يعطي هلاماً محكماً ويمكن أن تستخدم لاختبار الفيروسات والمزارع طويلة المدة. يوصي بآجار التغطية ١,٥٪ للاستنساخ أو رؤية البقع الفيروسية بالمتعادل الأحمر. عند الحاجة لإزالة الأغطية المنزلقة من تحت الآجار يمكن استخدام آجار لين يحتوي على ٠,٤ – ٠,٦٪ آجار. لاحظ أن المكونات لا يمكن أن تخلط وتذاب بعد ذلك بسبب تجلط المصل. يذاب الآجار في ميكروويف ويبرد حتى ٤٢ – ٤٥ °م في حمام مائي. جهز وسط 2x ويدفأ حتى ٣٧ – ٤٢ °م، واخلط الجزأين وأضفه للمزرعة. الحرارة النهائية لوسط الآجار سوف تهبط بسرعة خفيفة ولا تسبب دماراً للخلايا.

تحضير مزارع الخلية Preparation of Cell Cultures

يشمل التجهيز إزالة الأعضاء بشكل معقم من الحيوان حديث القتل أو من أجنة البيض. تقطع الأعضاء ميكانيكياً إلى أجزاء صغيرة، وتغسل لإزالة كرات الدم الحمراء وتنتشر إلى معلق خلايا مفردة بالهضم الإنزيمي بالتربسين. تغسل الخلايا لإزالة التربسين وتعلق في وسط النمو وتعد وتوضع في أوعية مزرعة الخلية المناسبة ثم توضع في حضانة ويسمح للخلايا بالنمو. لوسائل العد المستخدمة يوصى بالآتي.

مزارع الخلية الليفية لأجنة الدجاج Chick Embryo Fibroblast (CEF) Cultures

هذه الطريقة يمكن أن تستخدم لمزارع خلية الجنين في العديد من الأنواع المختلفة. تستخدم الأجنة عند حوالي منتصف فترة التحضين (٩ – ١١ يوماً لأجنة الدجاج).

الجدول رقم (٤٢,٢). مكونات أوساط مزرعة الخلية شائعة الاستخدام[A].

الرقم	اسم الوسط	المكونات	الكمية
1	M20[B]	10x و M-199	٩٠ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	١٠٠ مل
		بيكربونات الصوديوم ١٠٪	٦,٣ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ١٠٠٠ مل
2	F10-199[C]	بودرة M199	٤,٥ جم
		بودرة Ham's F10	٥,٥ جم
		شوربة فوسفات تربتوز	٧,٥ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ١٠٠٠ مل
3	Leib-McCoy[C]	بودرة ليبوفيتس L-15	٨,٧٦ جم
		بودرة McCoy's 5A معدلة	٥ جم
		بيكربونات الصوديوم	٠,٩٤ جم
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ١٠٠٠ مل
4	LH[D]	متحلل زلال اللاكتوز 10x	١٠٠ مل
		محلول ملح هانك 10x	٩٠ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	٨٠٠ مل
		بيكربونات صوديوم لضبط pH ٧,٣ — ٧,٥	–
5	BME[E]	بودرة BME	٩,١٨ جم
		شوربة فوسفات تربتوز	٣,٤٨ مل
		بيكربونات الصوديوم	١,٠٤ جم
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		محلول بيكربونات صوديوم لضبط pH ٧,٣ — ٧,٥	–
6	LMH[F]	1x Leibovitz's L-15	٣٨٥ مل
		1x McCoy's 5 بمعدل	٣٨٥ مل
		بيكربونات الصوديوم ١٠٪	٢ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	٥٠ مل
		2-Mercaptoethanol, 1 mM	١٠ مل
		بيروفات الصوديوم 100x	١٠ مل

تابع الجدول رقم (٤٢,٢).

محلول جلوتامين ٢٠٠ مللي مول	١٠ مل
خليط مضادات حيوية	١٠ مل
مصل دجاج	١٠٠ مل
مصل دم أجنة الأبقار FBS	٨٠ مل

[A] gs = كمية كافية، BSS = محلول ملح متزن، BME + وسط أساسي إيجل، FBS = مصل أجنة الأبقار، CK = كلية الدجاج، CFE = الخلايا الليفية لجنين الدجاج.

[B] M20 مزودة بـ ٥٪ FBS (M25) تستخدم كوسط نمو لخلايا CK.

M20 مزودة بـ ٢ ٪ FBS (M22) تستخدم كوسط نمو لـ CEF.

وسط حفظ يحتوي ٠,٢٥٪ FBS (M20.25).

[C] F10-199 و Leib-McCoy مزودة بـ ٤٪ مصل عجول تستخدم كوسط نمو لخلايا جنين الدجاج الليفية وCEF. لوسط حفظ أضف مصل عجل ١٪. حالياً نحن نستخدم F10-199 مع ٠,٢٥٪ مصل أجنة أبقار كوسط حفظ لخلايا CK.

[D] LH مزودة بـ ١٠٪ مصل عجول تستخدم كوسط نمو لخلايا CEF. وسط حفظ يحتوي ٢٪ مصل عجول.

[E] BME مزودة بـ ٥٪ FBS تستخدم كوسط نمو لخلايا CK. وسط حفظ يحتوي ١٪ FBS.

[F] LMH تستخدم لزراعة خطوط الخلايا للخلايا الليمفاوية والخلايا الليمفاوية النخاعية. RPMI-1640 يمكن أن تستخدم للإحلال مكان McCoy و Leibovitz. تحتاج خطوط خلايا معينة مصلاً أقل.

١) افحص مجموعة من أجنة بيض الدجاج عمر ٩ — ١١ يوماً لحيويتها.

٢) نظف سطح القشرة بالغمس في كحول لمدة ٥ دقائق أو بمسحها بصبغة اليود. لا تستعمل بيضاً ملوثاً أو متسخاً.

٣) احمل البيض بعد ارتداء القفاز واترك الكحول الزائد يصفى، واقطع حول القشرة تحت غرفة الهواء، وانزع هذا الجزء. احصل على الجنين بوضع ملقط رباعي السنون تحت عنقه واسحبه بحرص حتى يتحرر من كيس المح. لا تستعمل الأجنة الملوثة بالمح لأنه سام للخلايا.

٤) احمل الجنين فوق قارورة الهضم بالتربسين واقطع الرأس خارجاً حتى يسقط الجسم داخل القارورة. يمكن أيضاً أن يوضع الجنين في كأس ويقطع بالمقص. يمكن التخلص من العيون والأطراف والأحشاء قبل التقطيع. يعطي هذا خلايا أولية أكثر تجانساً لكنه أكثر إجهاداً.

٥) انقل الأنسجة المهروسة إلى قارورة التربسين أوإيرلينماير (Erlenmeyer). اغسل بإضافة ٣ مل محلول ملح فسيولوجي معقم لكل جنين وقلّب واترك القطع لترسب وتخلص من السوائل الرائقة. كرر الغسيل حتى يكون السائل صافياً وخالياً من الدم واسكب عندئذ محلول ملح فسيولوجي معقم بقدر الإمكان.

الجدول رقم (٤٢,٣). مكونات أوساط آجار التغطية (Agar Overlay Media).

الرقم	اسم الوسط	المكونات	الكمية
1	2x M20[B]	10x و M-199	٩٠ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	٥٠ مل
		بيكربونات الصوديوم ١٠٪	٦,٣ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		ماء خالي من الأيونات	حتى ٤٠٠ مل
		آجار ٢٪	٤٠٠ مل
2	2x LH	محلول 2x Earle يحتوي ١,٣٪ من متحلل زلال اللاكتوز	٥٠٠ مل
		١٪ محلول المتعادل الأحمر	١٠ مل
		آجار ١,٦ – ٣٪	٤٨٠ مل
3	2x F10-199	M199 2x	٢٢٥ مل
		وسط 2x F10 Ham	٢٢٥ مل
		شوربة فوسفات تربتوز	٥٠ مل
		مصل عجول	٥٠ مل
		خليط مضادات حيوية	١٠ مل
		بيكربونات صوديوم ٧,٥٪ (كمية كافية لضبط pH حتى ٧,٣ – ٧,٥)	
		آجار ١,٦٪	٤٥٠ مل

[A] يذاب الآجار ويبرد حتى ٤٢ – ٤٥ °م، يدفئ الوسط 2x حتى ٤٢ °م ويخلط الجزئين.

[B] يمكن أن تستخدم مع أو بدون مصل.

[C] يستخدم المتعادل الأحمر لصبغ المزارع المصابة بالعوامل الممرضة الخلوية. تصبغ الخلايا الحية باللون أحمر ولا تصبغ الخلايا الميتة (البقع أو plaques).

٦) أضف ٤٠ – ٥٠ مل من محلول تربسين فيرسين الذي سبق تسخينه عند ٣٧ °م مع الهز المتقطع أو استخدم مقلباً مغناطيسياً. بعد ٥ دقائق اترك القطع تترسب وتخلص من الرائق بحرص خلال طبقتين من شاش معقم في كأس. انقل المعلق إلى قوارير طرد مركزي كبيرة تحتوي على ٥٪ (حجم/حجم) من مصل العجول أو مصل أجنة الأبقار وتوضع على حمام ثلجي لمدة ٥ دقائق على الأقل. إذا لم تقطع الأجنة بالمقص، تمزق الأجنة في محلول ملح فسيولوجي معقم بترك عمود التقليب يدور بسرعة متوسطة وتغسل مرة بمحلول تربسين فيرسين قبل الهضم بالتربسين.

٧) كرر الطريقة ثلاث إلى أربع مرات حتى يترك فقط الأنسجة الليفية البيضاء ولا يكون المزيد من بقايا الخلايا بمعنى أن يكون التربسين صافياً تقريباً. اخلط المعلقات الخلوية المجموعة من كل عمليات التربسين. البديل هو إجراء عملية التربسين ٣ – ٤ مرات، ويحتمل أن يجرى لمرة واحدة لمدة ساعة، واستعمل ٢٠ مل من محلول

تربسين–فيرسين لكل جنين وحضن لمدة ساعة عند ٢٥°م أو ٣٧°م مع تقليب ثابت. اجمع الخلايا كما سبق وصفه.

٨) اطرد مركزياً لعشرة دقائق عند ٣٥٠ إكس جي. إعادة الطرد المركزي تكون اختيارية. تخلص من التربسين.

٩) أضف ١٠٠ مل من وسط النمو (الجدول رقم ٤٢,٢) لكل ملليتر من الخلايا المعبأة وقلب الخلايا المرسبة بالشفط المتكرر الهادئ بالماصة أو بهدوء مستخدماً هزاز.

١٠) احسب حاصل الخلايا. المعلق ١٪ من الخلايا المعبأة كما وصف سابقاً يحتوي حوالي ٢ x ١٠^٦ خلية/مل. يحتاج الإحصاء الدقيق لعدد الخلايا الحية إلى استعمال جهاز عد خلايا الدم ومجهر. تشمل الطريقة الأخيرة نقل ١ مل من معلق الخلايا إلى أنبوبة، وأضف نقطة من صبغة التريبان الأزرق ١٪ واخلط جيداً. لأفضل نتائج حضن الخلايا مع الصبغة لمدة خمس دقائق عند درجة حرارة الغرفة. الخلايا زرقاء الصبغة تكون ميتة وعديمة الصبغة تكون حية. عد كل الخلايا عديمة الصبغة، والخلايا المزدوجة والثلاثية والمتجمعة تعد على أنها خلية واحدة، ويجب أن يحتوي المعلق على أكثر من ٩٥٪ خلايا حية. إذا كان أقل من ٨٠٪ حياً بهذا الاختبار تكون الخلايا غير مناسبة للمزرعة. الخلايا البذرية بمعدل ١ x ١٠^٦ إلى ٢ x ١٠^٦ خلية/مل للمزرعة الثابتة ومعدل ٤ x ١٠^٦ خلية/مل للزجاجات المدوارة. هذه التركيزات الخلوية تعطي طبقة واحدة في ٢٤ ساعة، والعدد الأقل للخلايا يمكن أن يستخدم عند عدم الحاجة إلى اندماج طبقة الخلايا خلال ٢٤ ساعة.

مزارع خلية كلية أجنة الدجاج أو مزارع خلية كلية الدجاج

Chick Embryo Kidney (CEK) Cell Culture or Chicken Kidneys (CK) Cell Culture

يمكن أن تجهز هذه المزارع من كلى أجنة الدجاج الخالية من الممرضات النوعية عمرها ١٩ – ٢٠ يوماً أو صيصان دجاج خالية من الممرضات النوعية عند عمر ١ – ٣ أسابيع. الطريقة العامة تكون كالآتي:

١) في حالة كلى الأجنة، احصل على الأجنة من البيض بشكل معقم. استخلص الكلى واجمعها في طبق بتري يحتوي محلول ملح فسيولوجي. في حالة كلى الدجاج اعدم الصيصان بسحق فقرات الرقبة أو بغاز ثاني أكسيد الكربون عن طريق الاستنشاق واغمرها في مطهر. اسلخ الجلد وافتح البطن وأزل الكلى بشكل معقم وضعها في زجاجة مع محلول محلول ملح فسيولوجي.

٢) اغسل كلى الدجاج ٢ – ٣ مرات بمحلول محلول ملح فسيولوجي بواسطة رج الزجاجة بعنف شديد. اترك قطع الكلى لترسو وتخلص من السائل الرائق. الغسيل ليس مهماً مع كلى أجنة الدجاج.

٣) اغسل مرة واحدة كما سبق مع ٥٠ مل من محلول تربسين فيرسين السابق تدفئته، واترك المعلق حتى يرسب لمدة دقيقتين قبل التخلص من المحلول الرائق.

٤) ضع التربسين كالتالي: أضف ٤٠ — ٥٠ مل من محلول تربسين–فيرسين دافئ حديث التحضير. رج بعنف وضع الزجاجة عند ٣٧°م لمدة ٥ دقائق، واسكب الرائق بحرص ومرره خلال طبقتين من الشاش إلى كأس أو قارورة تحتوي على ٥٪ (حجم/حجم) مصل عجل. احفظ هذه الخلايا عند ٤°م. كن حريصاً لتبقى قطع الكلية في الزجاجة لعملية التربسين الإضافية.

٥) كرر الخطوة ٤، كل مرة أضف الحصاد لنفس الوعاء حتى تجمع خلايا كافية أو حتى يستنفذ نسيج الكلى.

٦) اسكب الخلايا إلى أنابيب طرد مركزي، واطرد مركزياً (١٠ دقائق عند ٣٥٠ إكس جي) وعلق الراسب في وسط النمو المناسب (الجدول رقم ٤٢.٢). عد الخلايا كما تم في مزرعة أجنة الدجاج الليفية، وعد تجمعات الخلية الصغيرة كخلية واحدة. ابذر ٠.٥ x ١٠^٦ إلى ١ x ١٠^٦ خلية/مل للمزارع الثابتة، وضاعف عدد الخلايا للمزارع المدوارة. سوف تتكون طبقة واحدة كاملة في ٤٨ ساعة. خلايا كلى الدجاج يمكن أن تعامل بالتربسين بشكل زائد بسهولة، وأفضل النتائج سوف يتم الحصول عليها عندما يوجد عدد من التجمعات الصغيرة من ٣ — ٥ خلايا في المعلق.

تحضير أنواع الخلية الأخرى Preparation of Other Cell Types

مزارع الخلية الليمفاوية Lymphocyte Cultures

تتكاثر فيروسات عديدة في الخلايا الليمفاوية. يمكن أن تحضر المزارع قصيرة العمر من الخلايا الليمفاوية الطحالية كالتالي:

١) اجمع الطحال من الدجاج كما وصف من الكلية وضع الطحال في محلول ملح فسيولوجي.

٢) ادفع الطحال بخفة خلال مصفاة من النايلون فتحاتها ٦٠ نانوميتراً (Tetco, Inc., Kansas City, Mo.; cat. no. 3-95-39) باستخدام محقن معقم ومحلول محلول ملح فسيولوجي. يمكن أن توضع شبكة النايلون فوق كأس زجاجي صغير وتغطى برقائق الألمونيوم وتعقم بالأوتوكلاف.

٣) اسكب معلق الخلية في أنابيب واطرد مركزياً لمدة ١٠ دقائق عند ٣٥٠ إكس جي، وأعد تعليق الخلايا في محلول ملح فسيولوجي وغطِّ المعلق بحرص على مسطح ٢ — ٤ مل (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.). اطرد مركزياً عند ٤٠٠ إكس جي لمدة ١٥ دقيقة واجمع الخلايا من السطح الفاصل.

٤) اغسل الخلايا في محلول ملح فسيولوجي وأعد تعليقها في وسط خلايا ليمفاوية (مثل LMH في الجدول رقم ٤٢.٢) عد الخلايا واضبط حتى ١ x ١٠^٦ – ٥ x ١٠^٦ خلية/مل. حضن الخلايا عند ٤١°م في حضان ثاني أكسيد الكربون.

تنخفض الحيوية سريعاً خلال ٢٤ — ٧٢ ساعة. وتعقب بإضافة وسط مناسب (CM) conditioned medium (انظر بأسفل) أو الإثارة بمحفزات الانقسام mitogens لمدة ٧٢ ساعة يعقبها إضافة CM أو وسط مناسب يمكن أن يطيل حيوية الخلايا الليمفاوية. الناقلات الكيميائية الخلوية cytokines المستنسخة مع استثناء الإنترفيرون ألفا وبيتا وجاما وإنترليوكين فهي غير متوفرة، لكن من المتوقع أن العديد من الإنترليوكينات سوف تصبح متاحة في المستقبل القريب. يتوقع أن استخدام هذه الإنترليوكينات سوف يسهل زراعة الخلايا الليمفاوية خاصة بعد الإثارة بمحفزات الانقسام.

الوسط المشروط الذي يحتوي على إنترلوكينات يمكن أن يجهز كالتالي: جهز خلايا ليمفاوية من الطحال كالسابق وأعد تعليقها بمعدل ٢ x ١٠^{٧} خلية/مل في LMH بدون مصل (قاعدة — LM) أو مع ٢٪ مصل دجاج (LM-2). استثر الخلايا بإضافة كونكانافالين A مقترن مع قطع أو خرز سيفاروز (Pharmacia Biotech). اغسل الخرز عدة مرات بمحلول الغسيل (٠,٥ عياري كلوريد صوديوم، ٢٠ مللي مول تريس، بي إتش ٧,٤) وعادل الخرز طوال الليل في ثلاثة أحجام من LM-base. اخلط أحجاماً متساوية من الخلايا الليمفاوية والخرز بنسبة ١٠^{٧} خلية/مل و٠,٣٪ (حجم/حجم) من الخرز. حضن الخليط لمدة ٤٨ ساعة واجمع السائل الرائق. هذه الطريقة هي أفضل من استخدام كونكانافالين A المقترن بخلايا الدم الحمراء (B. W. Calnek and K. A. Schat, unpubl. data). السائل الرائق يمكن أن يستخدم كمصدر للوسط المشروط أو يمكن أن ينقى أكثر عند الرغبة في ذلك. جمد عند —٧٠°م للحفظ طويل الأمد.

خلايا كبد جنين الدجاج Chick Embryo Liver Cells

استخدم أجنة عمرها ١٤ — ١٦ يوماً. اجمع الكبد واطحنه رفيعاً. خلايا الكبد هشة، لذلك تجرى عملية التربسين بحرص. لا ترج أو تقلب بشدة.

خلايا الرئة، القلب، الغدد التناسلية لجنين الدجاج
Chick Embryo Lung, Heart, and Gonadal Cells

استخدم أجنة ١٤ — ١٦ يوماً لخلايا الرئة و٢٠ يوماً للقلب والغدد التناسلية، وجهز الخلايا بنفس طريقة الخلايا الليفية لجنين الدجاج.

خلايا أوتار جنين الدجاج Chick Embryo Tendon (CET) Cells

اجمع الأوتار القابضة من الأقدام من أجنة عمرها ١٧ — ١٨ يوماً. حضن الأوتار طول الليل في وسط Ham's F10 مزود بـ ٥٠ ميكروجرام/مل أسكوربات الصوديوم والمضادات الحيوية ويعقب ذلك الهضم بالتربسين ٠,٢٥٪ والكولاجين ٠,٢٪ لمدة ٢ — ٣ ساعات في وسط إيجل المعدل بواسطة دلبيكو المزود بـ ٥٠ ميكروجرام/مل

أسكوربات الصوديوم، ومضادات حيوية و٥٪ مصل أجنة الأبقار. تستخدم خلايا أوتار جنين الدجاج لدراسة فيروسات الريو في الطيور (5).

خلايا أمعاء الطيور Avian Intestinal Cells

مؤخراً، طورت مزارع خلية أمعاء الطيور وقد تعطي وسيلة مفيدة لعزل ممرضات الطيور المعدية ودراسة تكاثر الكوكسيديا. وصفت الطريقة باستعمال خلايا الأعورين من الرومي عقب الفقس وخلايا الأمعاء للرومي حديث الفقس (3, 2). يستأصل الأعوران ويغسلان عدة مرات بمحلول إتش بي إس إس HBSS المحتوي على مضادات حيوية، وشقه طولياً وقطعه إلى أجزاء صغيرة. اغسل عدة مرات بشدة بمحلول إتش بي إس إس، وقطع القطع أكثر بمشرط، وعلق في محلول إتش بي إس إس يحتوي على ٣٠٠ ميكروليتر/مل من إنزيم كولاجين، و٠,١ جرام/مل دايبيز وحضن لمدة ٣٠ دقيقة مع التقليب. اسحب القطع بعنف واحصد الخلايا وعلقها بمعدل ١ x ١٠^{٦} – ٢ x ١٠^{٦} خلية/مل في وسط النمو المحتوي على M-199 مزودة بـ ٤,٥ مجم/مل جلوكوز، و٥٪ مصل أجنة العجول، و٥ ميكروجرام/مل هيبارين، و٢,٥ ميكروجرام/مل إنسولين، و١٠ نانوجرامات/مل عامل نمو الخلايا الجلدية، ومضادات حيوية قياسية، و٠,٢٪ جنتاميسين. يمكن أن تمرر هذه الخلايا عدة مرات. تم عمل خط خلايا للطيور (3).

يمكن أن تؤخذ خلايا أمعاء الرومي من الأمعاء المفتوحة طولياً لكل الجهاز المعوي (2). تحضن القطع في ٠,١٥٪ إن–أسيتيل سيستيين لمدة ٢٠ دقيقة عند درجة حرارة الغرفة مع تقليب خفيف لإزالة المخاط. يحصل على الخلايا بالرج الهادئ لقطع ٢ – ٣ سم في وسط أساسي أدنى Joklik's modified minimum essential medium (GIBCO-BRL) مزود بـ ٢٥ مللي مول HEPES، و٢,٥ مجم/مل جلوكوز، و١٪ زلال مصل الأبقار، و٥٠ ميكروجرام/مل جنتاميسين، و١ مللي مول إديتا. تخلص من الخلايا المأخوذة في فترة أول خمسة دقائق. احصد الخلايا بعد ٢٥ دقيقة من التحضين واغسل عدة مرات لإزالة الإديتا. علق الخلايا من الطبقة الأعلى واغسل عدة مرات وعلق في وسط النمو الذي يتكون من إما CMRL-1066 أو الوسط الأساسي الأدنى المزود بـ ٢٥ مللي مول HEPES، و٥٪ مصل أجنة العجول، و٥٪ مصل دجاج، ومضادات حيوية، و٢ مجم جلوكوز/مل، و٣٨ ميكروجرام/مل حمض أسكوربيك، و١,٥ ميكروجرام/مل ترانسفيرين، و٤ مللي مول (جلوتامين–إل)، و١٠$^{-٨}$ سليلينايت الصوديوم، و٢٠ نانوجرام/مل عامل نمو الطبقة الجلدية، و٥ ميكروجرام/مل بينتاجاسترين، و١٠$^{-٨}$ حمض ديوكسي كوليك، و٠,٢ ميكرومول بروجيسترون، و٢٥ نانوجرام/مل تراي أيودو ثيرونين، و١٠ ميكروجرام/مل إنسولين، و٥ ميكرومول يوتريسكين (بي إتش = ٦,٩). تؤخذ النتائج المثلى بفرد الخلايا الجلدية على طبقات التغذية للخلايا الليفية النخاعية الأولية عندما تصل إلى ٤٠ – ٥٠٪ من الانفصال.

نمو وحفظ مزارع الخلايا Growth and Maintenance of Cell Cultures

يمكن أن تنمو الخلايا المنتشرة المحضرة بالطرق السابقة في أنواع مختلفة عديدة من الأوعية اعتماداً على الغرض الرئيسي. عادة تُنمى المزارع في قوارير زجاجية أو بلاستيكية أو أطباق بتري أو أطباق دقيقة متعددة تحتوي على ٤ – ٩٦ حفرة. يعتمد العدد المرغوب من الخلايا على عدة عوامل تشمل:

١) نوع ومستوى تمرير الخلية: في العموم تزرع المزارع الأولية مع عدد كبير من الخلايا لكل ملليتر أكثر من المزارع الثانوية. خطوط الخلية يمكن أن تعد غالباً حتى ٥ x ١٠^{٤} – ١ x ١٠^{٥} خلية/مل.

٢) استخدام مزارع الخلية: تتكاثر أنواع معينة من الفيروسات أفضل في الخلايا نشطة الانقسام، بينما تستطيع أنواع الفيروسات الأخرى أن تتكاثر في المرحلة الثابتة. قد يختلف المستوى الأمثل بين المعامل المختلفة ويتحدد غالباً بالمحاولة والفشل. الأوعية التي تفتح في الجو (مثل أطباق بتري أو الأطباق متعددة الحفر والقوارير أو الأنابيب ذات الأغطية غير المحكمة)، يجب أن تحضن عند ٣٧.٥ – ٣٩ °م في هواء يحتوي على ٣٪ – ٥٪ ثاني أكسيد الكربون و٨٠٪ – ٨٥٪ رطوبة لتجنب فقد ثاني أكسيد الكربون، لجعل المزارع قلوية ولمنع تبخر الماء من الأوساط. المزارع في الأنابيب المغلقة لا تحتاج لك أ، أو جو رطب. في حالة صحة عدد الخلايا وظروف المزارع، يجب أن تتكون الطبقة الواحدة في ١٨ – ٢٤ ساعة للخلايا الليفية النخاعية.

الطبقات الواحدة على أغطية زجاجية Monolayers on Coverslips

يمكن أن تنمو الخلايا على أغطية زجاجية موضوعة في أطباق بتري أو في أنابيب لايتون Leighton. يجب أن تجهز الأغطية الزجاجية كما وصف في الأوعية الزجاجية الأخرى. ضع الأغطية المعقمة في أطباق أو أنابيب، وأضف معلق الخلايا على سطح الغطاء. تأكد أن الأغطية تكون على قاع الطبق ويمكن إزالة فقاعات الهواء بهدوء بطرف الماصة. الطرق الأخرى تكون كما وصفت سابقاً. يمكن حصد الأغطية بطريقة معقمة بعد زمن مناسب. استخدم وسط آجار طري (٠.٥٪) في حالة الحاجة لتغطية الطبقة الواحدة بالآجار المحتوي على الوسط حتى لا يجذب الطبقة الواحدة من الغطاء أثناء الجمع.

حفظ مزارع الخلية Maintenance of Cell Cultures

يستبدل وسط النمو بوسط أقل نسبة في المصل (وسط الحفظ) عندما يتم تكوين المزارع الطبقية الكاملة. استبدل وسط الحفظ كل ٢ – ٣ أيام اعتماداً على التغير في درجة الأس الهيدروجيني. يستخدم غالباً وسط آجار التغطية لحفظ خلايا كلى الدجاج (الجدول رقم ٤٢.٣)، بالرغم من أن خلايا كلى الدجاج تستمر روتينياً لمدة ٦ – ٨ أيام في وسط F10-199 (الجدول رقم ٤٢.١) المزود بـ ٠.٢٪ مصل أجنة العجل. إذا استخدم وسط آجار التغطية، من المهم إضافة كمية صغيرة من وسط آجار التغطية كل ٢ – ٣ أيام لمنع جفاف الآجار.

خطوط الآجار والمزارع الثانوية Cell Lines and Secondary Cultures

خط الخلية هو عدد من الخلايا يشتق من نسيج حيواني وينمى خارج الجسم الحي لمدة ستة أشهر أو أكثر على الأقل لأكثر من ٥٠ تمريرة متتالية. خط الخلية المستنسخ هو خط خلية مشتق من خلية مفردة تحتوي فقط على نواة واحدة. خطوط الخلية وخطوط الخلية المستنسخة تستخدم بكثرة في مزارع خلية الثدييات لكن ليس في مزارع خلية الطيور مع استثناءات قليلة. خط خلية QT-35 صنع من خلايا سرطانية ليفية كونت نتيجة إضافة ميثيل كولانثرين في السمان الياباني. خط خلايا الدجاج الليفية النخاعية الخالي من الفيروس (CHCC-OU2) استخدم مؤخراً لزراعة فيروس مرض مارك (1). ظاهرياً، يمكن أن يظل فيروس مرض مارك كامناً في هذه الخلايا عند عدم ترك الخلايا لتصل لتكوين طبقة كاملة. العديد من خطوط الخلية الليفية النخاعية fibroblast الأخرى قد وصفت لكنها يحتمل أن تكون إيجابية للفيروسات الارتدادية retroviruses. طور العديد من خطوط الخلية الليمفاوية النخاعية من سرطانات نتيجة لفيروس مرض مارك وفيروس سرطانات الطيور وفيروس ريتيكلوإندوثيليوزيس.

مزارع خلايا أجنة الدجاج الليفية الأولية وبعض المزارع الأولية الأخرى يمكن أن تستمر بواسطة عمل عدد محدود من التمريرات بدون إدراك خط خلية. يمكن حصد كميات كبيرة من خلايا أجنة الدجاج الليفية عند ٤٨ ساعة (انظر لاحقاً) وتحفظ في النيتروجين السائل (انظر أسفل) للاستخدام المستقبلي. هذه التقنية لها مميزات متعددة عن التجهيز المتكرر للخلايا الأولية.البيض الخالي من الممرضات النوعية وتجهيز الخلايا الأولية يعتبر مكلفاً. يمكن معايرة مجاميع من الخلايا المجمدة للنمو الأمثل، الأمر الذي يسهل استخدام خلايا أجنة الدجاج الليفية عند وقت الملاحظة. عموماً، لا يمكن أن تُكرر زراعة خلايا أجنة الدجاج الليفية بشكل كافي لأكثر من أربعة تمريرات، إلا أن إضافة مصل دجاج ١٪ إلى وسط النمو والتحضين عند ٤١ °م يسهل التمريرات الإضافية.

تمرير مزارع الخلية Passage of Cell Cultures

استخدم الطريقة التالية لتجهيز المزارع الثانوية أو لتمرير خط الخلية:

١) تخلص من الوسط الرائق.

٢) اغسل الخلايا لوقت قصير بمحلول محلول ملح الفوسفات (الذي يجب أن يكون خالياً من الكالسيوم والماغنسيوم عند استخدام فيرسين كمحلول انتشار) لإزالة الأيونات ثنائية التكافؤ المتبقية (التي تعطل الفيرسين). أحياناً يتبع هذه الخطوة غسيل قصير بمحلول تربسين فيرسين.

٣) أضف مباشرة محلول تربسين فيرسين كافي لتغطية المزرعة وحضن عند درجة حرارة الغرفة أو ٣٧ °م حتى تستدير الخلايا وتأخذ في الانفصال عن السطح. مبدئياً يحدد الوقت المستهلك لاستدارة الخلايا بالفحص المجهري المتكرر، على الرغم أنه مع وجود الخبرة يكون الفحص المجهري ليس ضرورياً.

٤) رج أو اسحب الخلايا المنفصلة وضَع الخلايا ومحلول تربسين فيرسين في أنبوبة طرد مركزي مع ٥٪ من المصل. احفظ الأنبوبة على الثلج حتى وقت الطرد المركزي. اشطف الأوعية بمحلول ملح الفوسفات لجميع الخلايا المتبقية. الخطوة الاختيارية للغسيل بمحلول ملح الفوسفات مهمة عند الحاجة لجمع كل الخلايا.

٥) اطرد مركزياً عند ٣٥٠ إكس جي لمدة ١٥ دقيقة وتخلص من الرائق وأعد تعليق الخلايا في وسط النمو.

٦) عند الرغبة، عد الخلايا كما وصف في المزارع الأولية.

٧) خفف الخلايا عند الضرورة وأبزرها في أوعية زراعة جديدة. في الأعم، تعطي المزرعة الأولية مزرعتين ثانويتين بنفس الحجم، بينما خطوط الخلايا الجاهزة يمكن أن تقسم إلى خمسة زراعات أخرى أو أكثر.

عامة، لا تلتصق خطوط الخلايا الليمفاوية النخاعية بأوعية المزرعة ويمكن أن يعاد زرعها ببساطة بإجراء العد وإعادة ضبطها حتى ٠,٥ x ١٠^{٦} خلية/مل. أحياناً يكون الطرد المركزي (١٥ دقيقة عند ٤٠٠ إكس جي) على Ficoll-Paque مطلوباً لإزالة الخلايا الميتة.

تجميد الخلايا Freezing of Cells

يمكن أن تجمد العديد من خطوط الخلية وكذلك الخلايا الأولية والثانوية للاستخدام اللاحق. الجهاز الوحيد المطلوب بالإضافة إلى الموجود في معظم المعامل هو مجمد بدرجات حرارة مناسبة. يمكن أن تجمد الخلايا إلى مالانهاية في النيتروجين السائل (-١٩٦ °م) أو لمدة أسابيع حتى شهور عند -٧٠ °م، على الرغم من تناقص الحيوية. الخلايا النامية النشطة بين ٢ — ٥ أيام بعد الفرد تعطي أفضل نتائج على الرغم أن الأخرى يمكن أن تستخدم شاملة الخلايا المفرودة مباشرة من الأعضاء وخلايا الدم. الطريقة تكون كالآتي:

١) جهز الخلايا كما وصف سابقاً في جزء تمرير مزرعة الخلية.

٢) اطرد الخلايا مركزياً عند ٣٥٠ إكس جي لعشر دقائق واستبعد الرائق.

٣) أعد تعليق الخلايا في وسط تجميد بارد عند تركيز حتى ٥ x ١٠^{٧} خلية/مل. يتكون وسط التجميد من وسط نمو (مثل M20 في الجدول رقم ٤٢,٢) مزود بـ ٧,٥٪ داي ميثيل سلفو أكساييد (ديمسو) و١٠ — ١٥٪ مصل.

٤) املأ عبوة الحفظ واغلقها بدون تأخير.

٥) ضع العبوة في إناء معزول في الحالة المتبخرة لوعاء النيتروجين السائل لمدة ٤٥ دقيقة حد أدنى أو في مجمد عند -٧٠ °م لمدة ٣ — ٢٤ ساعة. التجميد الأمثل يتطلب انخفاضاً تدريجياً للحرارة بمعدل حوالي ١ درجة/دقيقة. تتوافر المجمدات المبرمجة لهذا الغرض ولكنها مكلفة وباهظة ولتجميد كميات صغيرة من الخلايا.

٦) انقل العبوة إلى المرحلة السائلة لوعاء النيتروجين السائل.

يمكن أن تصنع الأوعية المعزولة من صندوق كرتون أو بلاستيك أو خشب أو معدن أو أوعية الماصات. يجب أن تحتوي على عازل كامن لتسمح بالانخفاض التدريجي في الحرارة (مثل العبوة مع الماء عند درجة الغرفة توضع في وعاء، سيأخذ الماء على الأقل ٣٠ دقيقة ليتجمد عند وضعه في −٧٠°م).

مباشرة قبل الاستخدام ترفع الخلايا من النيتروجين السائل وتوضع في الماء عند درجة حرارة الغرفة. ينصح بإضافة ١٠٪ (حجم/حجم) من مطهر مثل ٥,٢٥٪ هيبوكلوريت الصوديوم (مثل كلوروكس) إلى الماء، لأن الفيروسات يمكن أن تتواجد في النيتروجين السائل نتيجة لتحطم الأمبولات. من المهم استعمال كمامة وجه وقفازات سميكة عند إزالة العبوة من النيتروجين السائل للحماية من قطع الزجاجة عند تحطم الأمبول. يجب أن يُرج الأمبول بثبات حتى ذوبان آخر قطعة ثلجية وتؤخذ المحتويات فوراً بشكل معقم وتخفف ببطء في وسط النمو. الأمثل، يمكن أن يخفف ١ مل من معلق الخلية من الأمبول في ١٠ مل من الوسط، وبعد ذلك يخفف أكثر إلى التركيز النهائي اعتماداً على عدد الخلايا الحية أو المعايرة السابقة لمجموعة الخلايا المجمدة.

تطبيقات تقنيات مزرعة الخلية في علم الفيروسات

Application of Cell-Culture Techniques in Virology

إن أكثر العوامل أهمية التي تؤخذ في الاعتبار في دراسات تشمل الفيروسات هي طريقة مزرعة الخلية المعرضة للإصابة بالفيروس ووسط النمو المناسب الخالي من الأجسام المضادة ومثبطات الخلية أو الفيروسات غير النوعية والظروف البيئية الأفضل لحفظ الخلايا أثناء الوقت الكامل للتجربة. يمكن أن يكتشف تكاثر الفيروس بالطرق الآتية:

١) يسمى التغير المورفولوجي للخلايا التأثير الخلوي الممرض ويتسبب بواسطة التغيرات المدمرة أو كما مع بعض فيروسات الأورام التحول تحت ظروف المزرعة الملائمة التي بها آجار التغطية وجرعة منخفضة من الفيروس المستخدم. يمكن مشاهدة التأثير المرضي الخلوي كبقع والتحول مثل بؤر. يمكن رؤية البقع بإضافة ١ مل من الأحمر المتعادل (١٪) إلى ١٠٠ مل من وسط آجار التغطية. بديلاً عن ذلك، قد يضاف الأحمر المتعادل مع آجار التغذية في وقت لاحق. احفظ المزرعة في الظلام بعد إضافة المتعادل الأحمر. الخلايا الحية تصبغ بينما الميتة تظهر كبقع صافية أو عديمة اللون.

٢) تكوين خلايا عملاقة ومدمج خلوي syncytia.

٣) ظهور أجسام احتوائية خلوية أو نووية تشاهد بصبغة بولي كروم.

٤) إحداث تغيرات في درجة الأس الهيدروجيني نتيجة للتغيرات في أيض الخلية.

٥) تغير صفات الادمصاص لخلايا الدم لغلاف الخلية.

٦) قدرة بعض الفيروسات غير الممرضة للتداخل مع أو تحفيز التأثير المرضي الخلوي للفيروسات الأخرى.

٧) الطرق المصلية التي تكتشف الأنتيجينات الفيروسية في أو على الخلية مثل التألق المناعي أو إليزا أو تثبيت المتمم.

٨) اختبار نواتج مزرعة الخلية في نظام عائل آخر.

٩) اكتشاف الأحماض النووية DNA أو RNA الفيروسية بالتهجين ساوزرن أو نورثن أو بتفاعل البلمرة المتسلسل أو تفاعل البلمرة المتسلسل الناسخ العكسي.

عزل الفيروس Virus Isolation

تعتمد الطرق كثيراً على الفيروس المشكوك في وجوده ونوع العينة المستخدمة، إلا أن الطرق التالية تكون مناسبة:

١) اجمع الأعضاء أو الأنسجة مثل الرئيتين والكبد والمخ بطريقة معقمة، وقطعها إلى أجزاء صغيرة وتطحن ميكانيكياً. حضر ١٠٪ (وزن/حجم) معلق باستخدام ملح الفوسفات أو بي إس إس مع مضادات حيوية 5x في حالة التلوث الشديد. يجب أن توضع المسحات في أنابيب تحتوي على بي إس إس BSS أو وسط نمو مع مضادات حيوية. للشحن أو النقل يجب أن تعبأ العينات لمنع التسرب حسب تعليمات الشاحن أو التعليمات الحالية وتنقل مجمدة. عند الاشتباه في فيروسات مرتبطة بالخلية يحصل على دم مع هيبارين أو معلق خلية مفردة. يجب أن يجهز معلق الخلية من أعضاء بدون تكسير الخلايا باستخدام شبكة من النايلون أو في جهاز طحن Tenbroeck (Fisher Scientific, Pittsburgh, Penn.) على ثلج أو بتمرير القطع المطحونة خلال محقن. عند الضرورة جمد معلق الخلايا كما سبق وصفه.

٢) استخدم معلقاً خالياً من الخلية مباشرة كطعم أو جمد وأذب عدة مرات أو عالج بالاهتزاز بالموجات فوق الصوتية لتحرير أكبر كمية من الفيروس. ينقى المعلق بالطرد المركزي لمدة ١٥ دقيقة عند ١٠٠٠ إكس جي. لا يجب أن يجمد الدم أو معلق الخلايا ويذاب أو يطرد مركزياً.

٣) للطعم الخالي من الخلية، تخلص من وسط النمو من المزارع وأضف جزءاً من السائل الرائق من الخطوة السابقة. يجب أن يوجد سائل كافي لتغطية طبقة الخلايا الواحدة. ينصح بحقن المواد غير المخففة وأيضاً تخفيفات ١ : ١٠ و ١ : ١٠٠ من الناتج لأن المواد السامة في العينات غير المخففة غالباً تسبب تدميراً غير نوعي للخلايا. غيِّر وسط المزرعة إلى وسط حفظ عند استخدام طعم خلوي. أضف الخلايا مباشرة إلى مزارع الخلية. سوف ترسب خلايا الطعم المحتوي على الفيروس على الطبقة الواحدة.

٤) حضن المزرعة لمدة ساعة عند ٣٨ – ٣٩ °م.

٥) اغسل الطبقة الواحدة بفيض من بي إس إس BSS لإزالة التلوث الزائد والمواد السامة من العينة (اختياري). في حالة ثبوت أهمية هذه الخطوة اغسل الطبقة الواحدة بحرص حتى لا تفصل الخلايا ضعيفة الالتصاق بالسطح. لا تغسل الطبقة الواحدة عند استخدام الطعم الخلوي.

٦) أضف وسط حفظ حديث وحضن عند ٣٨ – ٣٩ °م.

٧) افحص الطبقة الواحدة المصابة وقَيِّمْها لمدة ٧ أيام على الأقل. في حالة عدم رؤية التدمير الخلوي أو عدم وضوحه اجمع الخلايا والسوائل من الأوعية وأجرِ تمريراً أعمى إلى خلايا طبقة واحدة جديدة. أحياناً يجب أن يجرى ٢ – ٣ تمريرات عمياء للحصول على دليل للتأثير المرضي الخلوي. لا تكون بعض الفيروسات تأثيراً مرضياً خلوياً في المزرعة ويجب أن تفحص لتغيرات أخرى. لمخزون الفيروس، يجب أن يُحصد السائل الرائق والخلايا عند بلوغ أقصى تأثير مرضي خلوي لكن قبل موت كل الخلايا. يمكن أن يجمد المعلق ويذاب أو يعالج بالاهتزاز بالموجات فوق الصوتية وينقى بالطرد المركزي منخفض السرعة ويحفظ مجمداً. تجمد الفيروسات المرتبطة بالخلية كما سبق شرحه وتحفظ في النيتروجين السائل. ينصح بجمع الفيروسات المرتبطة بالخلية قبل أقصى تأثير خلوي مرضي، عندما تكون الخلايا أفضل حيوية.

المراجع References

1. Abajoub, A., and P. M. Coussens. Development of a sustainable chick cell line infected with Marek's disease virus. Virology 214:541-549. 1995.
2. Alt, A., and D. L. Reynolds. Primary cell culture of turkey intestinal epthelial cells. Avian Dis. 40:103-108. 1996.
3. Augustine, P. C. Establishment of a turkey cecal cell line and development of turkey coccidia within the cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 206:152-156. 1994.
4. Freshney, R. A. Culture of animal cells. A manual of basic technique, 2nd ed. Alan R. Liss, Inc., New York, N.Y. 396 pp. 1987.
5. Huang, D. D. Restriction of avian reovirus in primary chicken embryo tendon cells. Virology 207:117-126. 1995.
6. Moscovici, C., M. G. Moscovici, H. Jiminez, M. M. C. Lai, M. J. Hayman, and P. K. Vogt. Continuous tissue culture cell lines dervived from chemically induced tumours of Japanese quail. Cell 11:95-103. 1977.
7. Versteeg, J. Color atlas of virology. Year Book Medical Publications Ltd., London, U.K. 233 pp. 1985.