

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

✉ حسین بهاروند Ph.D.*، محمد پاکزاد B.Sc.*، عادل 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 زیست‌شناسی سلولهای انسانی به سرعت در حال پیشروی است. پتانسیل بالای این سلولها مسیر نوینی در راستای طب پیوند، توسعه داروسازی، سم‌شناسی، زیست‌شناسی تکوینی انسان و تحقیقات در زمینه سرطان گشوده است. حصول این پتانسیلها نیازمند درک جنبه‌های اصولی سلولهای hES شامل حفظ آنها در شرایط آزمایشگاهی کیفیت سلولها در حالت پر توانی و بهبود روشهای فن آور، پاساژ و انجماد است. تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی بر سلولهای مغذی فیبروبلاست موشی، روش ساده و متداول برای تمرین تولید سلولهای hES است. در این فصل، به روش قدم به قدم تولید سلولهای بنیادی جنینی انسانی و موشی، نگهداری، پاساژ و انجماد آنها پرداخته می‌شود و در نهایت در مورد لزوم استانداردسازی روشهای کشت و تولید سلولهای hES بحث می‌شود.

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

مقدمه

بر خلاف سلولهای سوماتیک، سلولهای بنیادی جنینی انسانی^۱ در شرایط آزمایشگاهی در حالت غیر تمایز یافته رشد می‌کنند. این سلولها قادر به حفظ پر توانی خود در شرایط موجود زنده^۲ و محیط آزمایشگاهی^۳ هستند. از طرف دیگر دارای فعالیت تلومرازی بالایی بوده و در طی کشتهای طولانی مدت

طول تلومر خود را حفظ می‌کنند. بنابراین شده که سلولهای hES منبع نامحدودی برای سلول درمانی بیماریهای ترمیمی وابسته به سن مثل پارکینسون، آلزایمر و جراحات نخاعی خواهند بود. مکانیسمهایی که سلولهای بنیادی جنینی برای فرار از پیری، تنظیم چرخه سلولی، ترمیم DNA و فعالیت تلومرازی اتخاذ می‌کنند با مکانیسمهای سلولهای بنیادی بزرگسالان و سرطانی متفاوت است.

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

✉ آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان جهاد دانشگاهی، گروه سلولهای بنیادی، صندوق

پستی ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴

E-mail: baharand50@yahoo.com

1- Human Embryonic Stem Cells (hES)

2- In vivo

3- In vitro

بودن این قابلیتها، مجموعه ای از ویژگیها را برای حالت تمایز نیافته hES در نظر می گیرند 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 از بزرگترین 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 می شود.

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 می شود از آن جمله از فیبروبلاستهای جنین موش^۱، یک رده نامیرا از فیبروبلاستهای موشی به نام دودمان STO، سلولهای کارسینومای مثانه انسانی ۵۶۳۷ و همچنین یک رده نامیرا از تخمدان هامستر چینی^۲ به نام CHO برای این کار استفاده می شود. 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 در اکثر مراکز تحقیقاتی استفاده می شود، فیبروبلاستهای جنین موش (MEFs) است که در گروه سلولهای بنیادی پژوهشگرده رویان نیز از این سلولها استفاده می شود که در زیر روش تهیه، کشت و نگهداری این سلولها آورده شده است.

تولید فیبروبلاستهای جنین موش

روش کار محققان حاضر بر اساس روش Abbondanzo SJ و همکارانش در سال ۱۹۹۳ است. هر مرکز تحقیقاتی از نژاد

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

خاصی از موش برای تولید MEF استفاده می کند که در این مرکز از موشهای نژاد NMRI استفاده می شود. همچنین لازم به ذکر است که از پاساژهای پایین MEF (معمولاً به طور متوسط تا پاساژ ۴) به این منظور استفاده می شود.

مراحل کار به شرح زیر است:

۱) تعدادی موش ماده را در کنار موشهای نر بگذارید (معمولاً دو موش ماده در کنار یک موش نر بالغ گذاشته می شود) روز بعد، موشهای ماده از نظر داشتن و یا نداشتن پلاک واژنی^۳ بررسی شوند. پلاک واژنی بیانگر انجام جفت گیری است. روز مشاهده پلاک روز نیم آبستنی محسوب می شود. موشهای ماده جفت گیری کرده را جدا کرده و در قفس جداگانه بگذارید.

۲) در روز ۱۲/۵ بارداری موشهای باردار را به طریق نخاعی کردن^۴ بکشید (شکل ۱- A). حفره شکم را باز کنید و رحم حاوی جنینها را خارج نمایید و در یک ظرف حاوی PBS عاری از Ca^{2+}/Mg^{2+} بگذارید (شکل ۱- B تا C). جنینها را از رحم خارج کنید و سپس کیسه زرده، آمینون و جفت را از آن جدا کنید (شکل ۱- D تا F). جنینها را دوبار دیگر با PBS عاری از Ca^{2+}/Mg^{2+} تازه بشوید 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 (شکل ۱- G).

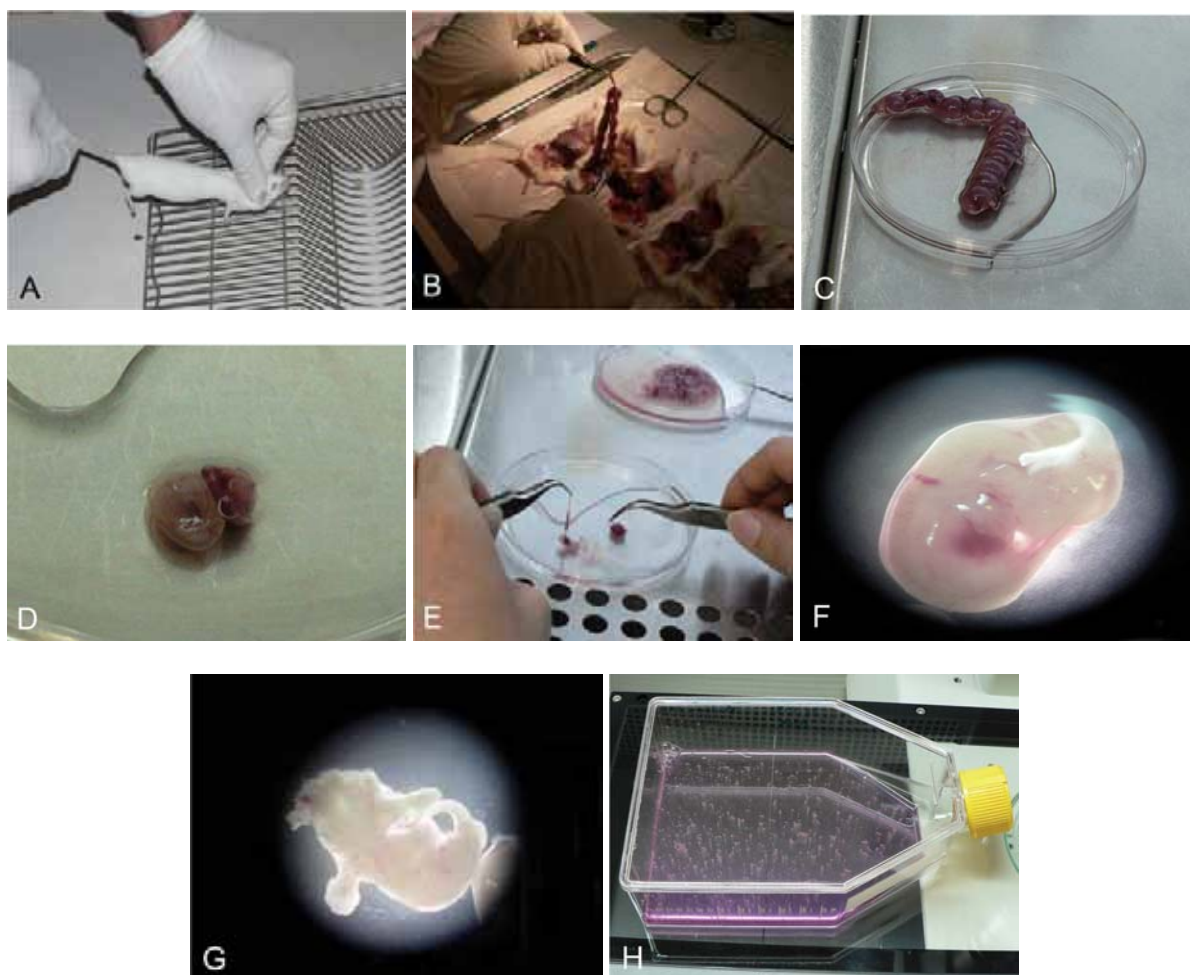
۴) تعداد ۵-۸ جنین مثله شده را در لوله یک سرنگ ۵ ml که دارای سوزن ۱۸ G است بگذارید.

۵) پیستون سرنگ را در سرنگ بگذارید و به مقدار ۲ ml از PBS عاری از Ca^{2+}/Mg^{2+} استریل یا محیط کشت سلولهای تغذیه کننده به آن اضافه کنید و سپس جنینها را ۳-۵ بار از سوزن رد کنید تا به قطعات کوچک تبدیل شوند سلولها را به یک فلاسک بزرگ 150 cm^2 منتقل کنید (شکل ۱- H). سپس

3- Vaginal Plaque; VP
4 Cervical Dislocation

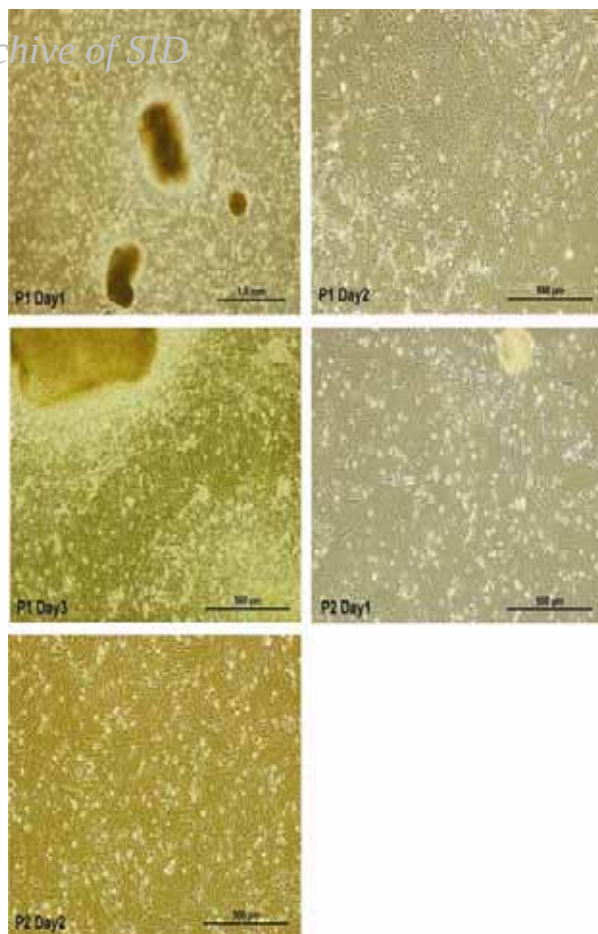
۲۰ ml محیط کشت سلولهای تغذیه کننده به آن اضافه کنید (طرز ساخت و محتوای محیط کشت سلولهای تغذیه کننده در پایان همین قسمت آمده است). فلاسک را به انکوباتور منتقل کنید. روز بعد تعویض محیط کنید تا ضایعات سلولی و قطعاتی که کف ظرف نجسبیده اند حذف شوند تقریباً مجموعه های سلولی به سرعت به فلاسک می چسبند و طی ۲-۳ روز سلولهای فیروبلاستی اغلب ظرف را می پوشانند (شکل ۲) و تا روز سوم، کف ظرف کاملاً پوشیده می شود (Confluent). لازم به ذکر است که واژه سلولهای تغذیه کننده

فیروبلاستی 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 فیروبلاستهای 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 نوروها دیده می شوند که مهم نیست زیرا در پاساژهای بعدی اغلب آنها از بین می روند.



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

Archive of SID



شکل ۲. کشت explant جنینهای سیزده روزه موش. به مهاجرت سلولها از explant 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 Ca^{2+} و Mg^{2+} بشویید.

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

(۴) 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.

(۶) چند بار سوسپانسیون را پیپت کنید تا سلولها به صورت

کل محیط فلاسک را بکشید سپس فلاسک را دوبار با PBS عاری از Ca^{2+}/Mg^{2+} بشویید (هربار ۱۰ ml) سپس محلول Trypsin/EDTA که قبلاً 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 آن ۱۰ ml محیط کشت سلولهای تغذیه کننده اضافه کنید تا آنزیم خنثی شود. سپس محتوای فلاسک را که اکنون ۱۵ ml 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 ۴ پاساژ اول است. بعد از آن سلولهای تغذیه کننده دارای کفایت لازم برای پشتیبانی از سلولهای بنیادی جنینی نیستند.

(۷) وقتی که به اندازه کافی سلولهای تغذیه کننده کشت داده شد یا می توان 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 بعداً ذکر خواهد شد). معمولاً بهتر است که سلولهای تغذیه کننده را در پاساژ دوم منجمد نمود. (نحوه پاساژ فیبروبلاستهای جنین موشی در ادامه خواهد آمد).

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

جدول ۲. ترکیبات محیط کشت سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

ترکیبات	مقدار
Deionized water	۸۳۷ ml
DMEM powder (+pyr)	۱۳/۵ gr
NaHCO ₃	۳/۷ gr
Pen/Strep	۱۰ ml
B-ME	۷µl
FBS	۱۵۰ml
pH Adjustment	۴/۲-۴/۷

۳) دی متیل سولفوکسید DMSO^۲ ۱۰ درصد

Archive of SID

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 در غیر این صورت DMSO تبخیر می شود.

ذوب سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

۱) ۱۹ ml محیط کشت سلولهای تغذیه کننده در یک فلاسک بزرگ (۱۵۰ سانتی متر مربع) بریزید (دمای اتاق) و در 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. در ضمن مشخصات آن را با آدرس مطابقت کنید.
۴) 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 بشوید.

۶) ویال را به زیر هود منتقل کنید و در آن را باز نمایید.
۷) با استفاده از یک پیت ۲ ml محتویات ویال را به فلاسکی که از قبل تهیه نموده اید، منتقل کنید.
دقت کنید نیازی به شستشوی سلولها نیست، زیرا DMSO در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تبخیر شده و از ظرف خارج می شود. پس از ۳-۴ روز سلولها کف ظرف را می پوشانند. طی این مدت نیازی به تعویض محیط نیست.

پاساژ سلولهای فیبروبلاستی جنین موش

معمولا سلولهای یک فلاسک بزرگ به ۳-۵ فلاسک بزرگ منتقل می شوند. ولی سه ظرف بهتر است. پاساژ سلولی به

تک سلولی در آیند.

۷) سوسپانسیون حاصل را بر دارید و به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm، 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 می کنند. بنابراین ۳-۵ ml محیط انجماد سرد شده به لوله اضافه کرده و سلولها را به آرامی پیت کنید (روش تهیه محلول انجماد در ادامه همین بخش آمده است).

۱۰) روی لوله های انجماد با مائیک 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 ۱ ml از سوسپانسیون سلولی اضافه شود.

۱۲) لوله های انجماد را به ظرف انجماد^۱ که از قبل در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شود 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 می شوند.

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

۱۴) مشخصات سلولها و آدرس آنها شامل شماره تانک، شماره holder و شماره rack در دفتر مخصوص تانک نیتروژن نوشته شود.

محلول انجماد سلولهای فیبروبلاستی جنین موش (MEF)

۱) سرم جنین گاوی (FCS) ۵۰ درصد

۲) محیط کشت سلولهای تغذیه کننده ۴۰ درصد

1- Cryocooler

2- Dimethyl Sulphoxide; DMSO

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 Ca^{2+} و Mg^{2+} بشویید.
- (۳) ۵ml محلول Trypsin/EDTA اضافه کنید و فلاسک را در دمای آزمایشگاه به مدت ۳ دقیقه نگهدارید.
- (۴) برای جداسازی کامل سلولها چند ضربه به کناره های فلاسک بزنید.
- (۵) ۱۰ ml محیط کشت سلولهای تغذیه کننده برای ختشی کردن آنزیم اضافه کنید و سوسپانسیون حاصل را پیپت کنید.
- (۶) به هر فلاسک جدید ۵ ml از سوسپانسیون سلولی اضافه کنید.
- (۷) ۵ ml دیگر محیط کشت سلولهای تغذیه کننده، به هر فلاسک بزرگ حاوی سوسپانسیون سلولهای فوق اضافه نمایید.
- (۸) فلاسک را به انکوباتور منتقل کنید.
- (۹) طی ۴-۳ روز سلولها کف ظرف را کاملاً می پوشانند.

تیمار فیبروبلاستهای جنین موش با مایتومایسین C

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

مایتومایسین C بین دو رشته DNA قرار می گیرد و از جدا شدن آنها طی فاز S اینترفاز جلوگیری می کند و بنابراین تقسیم سلولی متوقف می شود. روش کار به شکل زیر است :

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

- (۲) ۱ ml 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.
- (۴) 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.
- (۶) غلظت نهایی مورد استفاده ۱۰µg/ml است. بنابراین به هر فلاسک بزرگ حاوی ۲۰ ml محیط کشت، مقدار ۱۰۰ µl از محلول ۲ mg/ml اضافه نمایید و فلاسک را به انکوباتور برگردانید و به مدت ۳-۱/۵ ساعت بگذارید. معمولاً ۱/۵ ساعت زمان مناسبی است. با این عمل تقسیم سلولهای تغذیه کننده به طور دائم متوقف می شود.
- (۷) بعد از ۱/۵ ساعت، محیط دارای مایتومایسین C را بردارید و سه بار فلاسک بزرگ را با PBS عاری از Ca^{2+} و Mg^{2+} بشویید (هر بار ۱۰ml). سپس ۵ ml محلول Trypsin/EDTA اضافه کنید (۳ دقیقه). با زدن دو یا سه ضربه به پهلوی فلاسک، سلولها را کاملاً جدا نمایید و به مقدار لازم محیط کشت سلولهای تغذیه کننده اضافه نمایید.
- (۸) برای پوشاندن کف ظرفهای مورد نیازتان می توانید دو کار انجام دهید، یا بر اساس نسبت سطح به سطح سلولها را به ظرفهایتان منتقل کنید، برای مثال فلاسکی با سطح ۱۵۰cm² معادل ۶ فلاسک با سطح ۲۵ cm² است یا اینکه با شمارش سلول در نهایت به هر ۲cm² از ظرفهایتان ۳۰۰۰ سلول منتقل کنید تا کف آنها پوشیده شود.

ظرف مدت کوتاهی سلولهای MEF به کف ظرف می‌چسبند و کف ظرف را به صورت تک‌لایه پرمی‌کنند. ۶-۱۲ 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 ظرف این مدت از آنها استفاده نشود باید دور انداخته شوند. نکته 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 [۴-۲] 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 ته صاف، برای کشت ICM و پاساژ اول و دوم سلولهای ICM موشی

Well 24 یا 4، برای دومین پاساژ کلونیهای شبه ESC موشی

فلاسک-T-25، برای کشت کلونیهای ESC موشی

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

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

۲) ۴۶-۴۸ ساعت بعد از تزریق PMSG، هورمون کوریونی انسانی^۲ به میزان ۷/۵ واحد به هر موش 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 جمع کنید. این روز، روز نیم بارداری در نظر گرفته می‌شود.

۴) 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 داخل Center-Well را با محیط کشت ESC که حاوی LIF ۵۰۰۰ IU/ml است تعویض کنید. سپس کف دیش ۳۵ mm² قطرات ۳۰ µl با محیط کشت ESC که حاوی LIF ۵۰۰۰ 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 مزاتری آن را نیز جدا کنید و داخل پتری دیش ۳۵ mm² حاوی محیط T6 قرار دهید.

۶) یک سرنگ انسولین بردارید و از محیط کشت T6 دارای ۴ mg/ml BSA، 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 قطرات ۳۰ µl انتقال دهید و انکوبه کنید.

1- PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotrophin

2- HCG: Human chorionic gonadotrophin

(II) اخذ بلاستوسیستهای ۵ تا ۷ روزه 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 از موش یا انسان، یک فرایند چند مرحله‌ای است که به طور شاخص شامل مراحل زیر است:

جداسازی توده سلولی داخلی (ICM) از تروفوکتودرم

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 تروفوکتودرم. به طور کلی 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 تغییر یافته در تولید سلولهای بنیادی جنینی نیز استفاده می‌شود.

جراحی ایمنی^۱

کلیات انجام این روش توسط Solter و Knowles در سال ۱۹۷۵ ارایه شد، که شامل برداشتن ناحیه شفاف^۲ (زونا پلاسیدا) با استفاده از محلول اسیدتایرود، انکوباسیون جنین

1- Immunosurgery
2- Zona pellucida

در آنتی بادی (که در اینجا آنتی بادی به سلولهای تروفوکتودرمی که در سطح قرار دارند متصل می‌شوند و نه به ICM که در قسمت داخل است) و سپس لیز کردن سلولهای تروفوکتودرم 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 جدا شده حاصل، بر سلولهای 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 ۳/۵ تا ۴ روز است.

نکته قابل توجه دیگر این است که، جنینهایی برای این کار مناسب اند که در حال تشکیل حفره بلاستوسل اند و تروفوکتودرم 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 ۴)
 - آنتی بادی علیه سرم انسانی^۳
- 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

3- Antihuman whole serum antibody

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 خوکچه هندی^۱

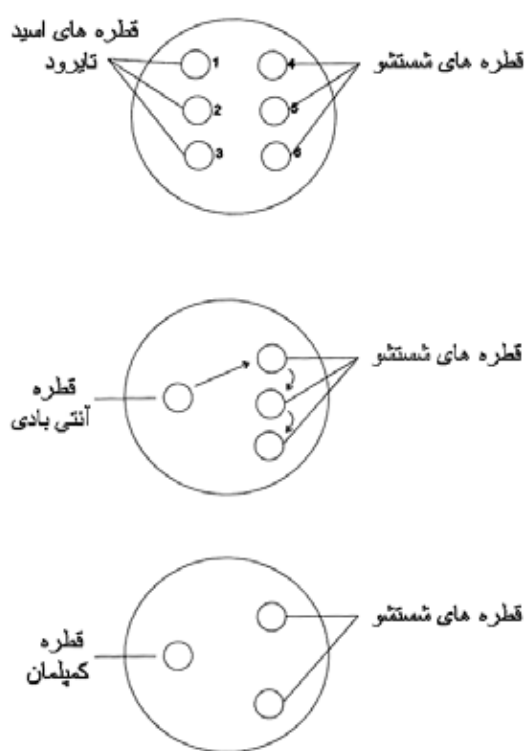
محتوای هر ویال کمپلمان را بر اساس مقدار مورد استفاده در هر مرحله، در میکروتیوبهای جداگانه تقسیم و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری کنید، هنگام استفاده با محیط کشت جداسازی hESC یا mESC به نسبت ۱:۱۰ رقیق و قطره گذاری نمایید پیت پاستور پردازش شده پیت پاستور را روی شعله نگه دارید تا گرم شود و سپس یکنواخت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

روش انجام کار

۱- در این فرایند هر جنین 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 ۳۰ μ l 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 CO₂ 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).

1- Guinea pig complement

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



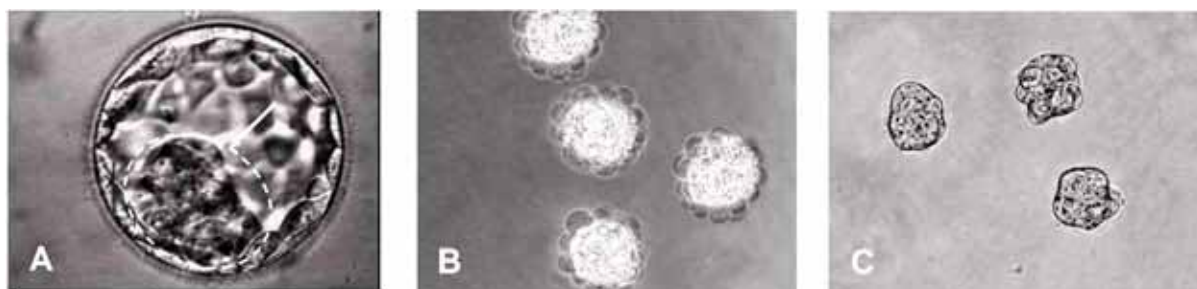
شکل ۳. قطره گذاری برای انجام جراحی ایمنی

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).

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

۱۵ دقیقه انکوباسیون جنین رامشاهده کنید، اگر ابزارهای ایمنی (سیستم کمپلمان و آنتی بادی) به خوبی عمل کرده باشند، سلولهای تروفوبلاستی به شکل بادکنکی و باد کرده دیده می شوند که نشان از لیز شدن این سلولها است (شکل ۴). اگر سلولهای تروفوبلاستی به شکل بادکنکی در نیامده باشند می بایست 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. باید توجه 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). ICM - ۵ را در قطره های محیط حاوی سرم شستشو دهید (مرحله ۲ انجام شود).



شکل ۴. (A) جنین در مرحله بلاستوسیست (پیکان ICM را نشان می دهد) (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 می شوند و طبق این رتبه بندی کل جنین و یا بخشی از آن کشت داده می شود. در این روش پس از کشت بلاستوسیست روی MEF و چسبیدن جنین به کف ظرف سلولهای تروفواکتودرم به صورت دو بعدی در سطح شروع به رشد می کنند ولی سلولهای ICM به صورت سه بعدی به سمت بالا تکثیر می یابند که معمولاً بعد از ۳ الی ۵ روز (برای جنینهای موشی) ۵ الی ۷ روز (برای جنینهای انسانی) به صورت یک برآمدگی گنبدی شکل دیده می شوند که در این هنگام با کمک یک پیپت (که قبلاً آنرا روی شعله نازک کرده ایم) می توان به راحتی ICM را از تروفواکتودرم جدا کرد. باید توجه داشت که به همراه ICM تعدادی از سلولهای تروفواکتودرم نیز جدایی

شوند که در کشت های بعدی خالص سازی می شود.

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 ۲۴ ساعت بعد به سلولهای تغذیه کننده می چسبد. در تمامی موارد، تقسیم سلولهای تغذیه کننده را قبل از هم کشتی با سلولهای بنیادی جنینی متوقف می کنند (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 ۹۶ خانه بهتر است (هر ICM در یک خانه از پلیت ۹۶ پوشیده شده با MEF

کشت داده شود).

همان طور که قبلاً نیز گفته شد سلولهای رایج تغذیه کننده، فیبروبلاست های جنین موش MEF هستند (که قابل ذکر است که MEF در اینجا تأمین کننده برخی مواد ناشناخته مورد نیاز سلولهای بنیادی جنینی و همچنین فراهم کننده غشای پایه‌ای (ECM)^۱ برای چسبیدن سلولها به کف ظرف است).

اخیراً برخی محققین که در راستای کشت سلولهای بنیادی در شرایط عاری از مشتقات حیوانی^۲ 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^۳

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

(۱) چهار روز پس از کشت بلاستوسیت، ICM را از تروفوبلاست به کمک پیپت پاستور جدا کنید و در 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، ۷۰ μl Trypsin-EDTA به سلولها اضافه کنید، بعد از گذشت ۱/۵ دقیقه به کمک سمپلر، ۴۰ بار پیپت کنید تا سلولهای ICM از هم جدا شوند. بعد از گذشت ۳ دقیقه از تیمار سلولها با تریسپین، ۷۰ μl 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 کرد که فضای کافی برای رشد داشته باشند. بهتر است قبل از آنکه لبه کلونی ها با هم تماس پیدا کنند و همچنین قبل از اینکه نشانه های تمایز در آنها مشاهده شود پراکنده شوند. وقتی کلونیه‌ها به آهستگی رشد می‌کنند، دو - سوم محیطش را هر ۲ الی ۳ روز تعویض کنید تا در تمام 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 در دیش ۹۶ خانه دیگری پوشیده شده با فیبروبلاستهای مایتومایسینه پاساژ دهید.

(۲) حدود دو روز بعد از پاساژ، اولین کلونیهای شبیه سلولهای 4ES ظاهر می‌شود (شکل ۵) که برای ازدیاد، باید پاساژ دهید و در ظرف Center-Well پوشیده شده با فیبروبلاست مایتومایسینه کشت دهید.

(۳) حدود ۴۸ ساعت بعد، کلونی های موجود در Center-Well به یک خانه از ظرف ۶-خانه پوشیده شده با فیبروبلاست پاساژ دهید.

1- Extra-Cellular Matrix; ECM

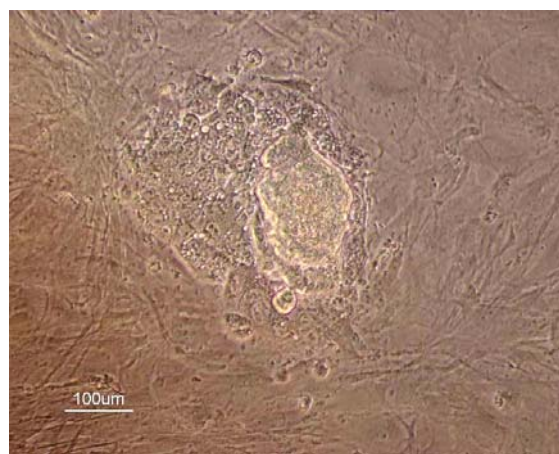
2- Xeno-free culture

3- ICM Dispersion

4 ES cell like

۴) حدود ۴۸ ساعت بعد، کلونیهای ESC موجود در ظرف ۶-خانه به فلاسک ۲۵cm² (T-25) پوشیده از یک لایه سلولهای تغذیه کننده مایومایسینه، انتقال داده دهید.

اولین کشت در فلاسک T-25 معادل اولین پاساژ 1(P1) در نظر گرفته می شود 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 تروفوکتودرم چسبیده به سلولهای MEF را نشان می دهد. همان طور که مشخص است تروفوکتودرم به صورت دوبعدی و ICM به صورت سه بعدی رشد کرده است.

سلولهای انسانی

با تکرار مرحله قبل بعد از ۶ الی ۸ روز کلونیهایی با مورفولوژی شاخص کلونیهای hESC به دست می آید، که بعد از این هر ۶ الی ۸ 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

1 Passage 1; P1

حالت غیر تمایزی و کاریوتایپ طبیعی خود را برای سالها حفظ کنند.

روش بهینه تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی

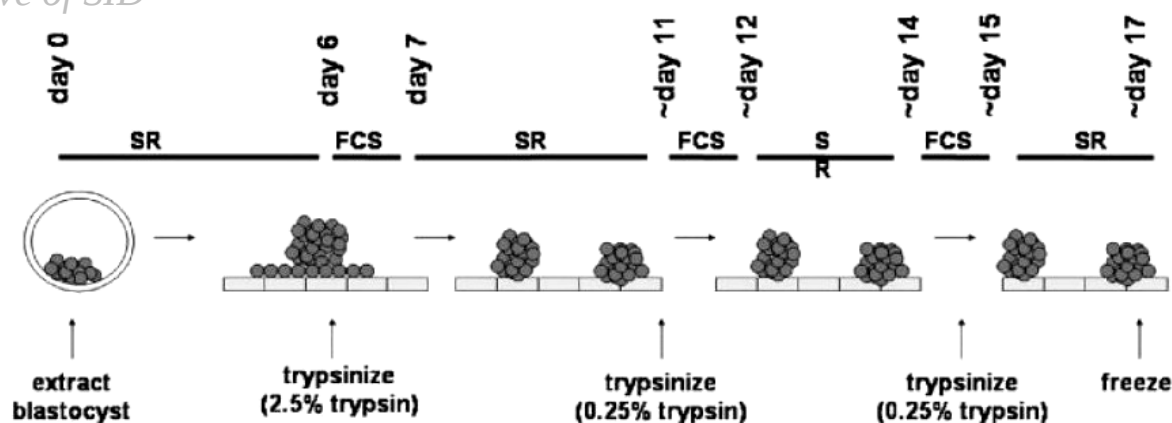
یکی از دغدغه های اکثر مراکز تحقیقاتی تولید رده سلولی از موشهای ترانس ژن است. روشهایی که تاکنون برای تولید رده های سلولی استفاده شده است زمان بر و با بازدهی نامعلوم است (که احتمالاً به دلیل استفاده از مواد و تجهیزات گوناگون در آزمایشگاههای مختلف است).

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 رده سلولی ۱۵ تا ۲۰ روز و بازدهی روش حدود ۵۰ درصد گزارش شده است [۵].

نکات و مراحل انجام این روش در شکل ۶ آورده شده است. ۱- در این روش به جای استفاده از پاساژهای ۳-۵ روزه MEF که قبلاً استفاده می شد، از پاساژهای اول یا دوم استفاده شده، چرا که پاساژهای بالاتر MEF زودتر به پیری می رسند و در کل قدرت کمی برای پشتیبانی از تولید رده سلولی دارند.

۲- نکته مهم دیگر این روش، استفاده از MEF هایی است که حداکثر یک روز بیشتر از زمان مایتومایسینه کردن آنها نگذشته باشد، چرا که MEF هایی که زمان بیشتری از مایتومایسین 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 ICM است.



شکل ۶. مراحل تولید سلولهای بنیادی جنینی موشی



شکل ۷. کلونیه‌های سلولهای بنیادی جنینی موشی رویان B1. به حالت دوکی شکل و سه بعدی کلونیه‌ها 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^۱ یعنی تعداد کلونیه‌های حاصل از سلولهای بنیادی جنینی اثر

کاشت (کشت)، داشت (نگهداری) و برداشت

(پاساژ و انجماد) سلولهای بنیادی جنینی 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 برای کشت آنها استفاده نمود و هر دو یا حداکثر سه روز (بسته به سرعت رشد) آنها را پاساژ داد (نسبت ۱ به ۳). در کل سلولهای بنیادی جنینی در زمان *sub confluence* آماده پاساژ یا انجماد هستند. در این زمان کلونیه‌ها، آنقدر رشد کرده‌اند که در مجاورت هم قرار می‌گیرند (شکل ۷). با نسبت ۱ به ۳، ظرف ۴۸ ساعت، کلونیه‌ها به حالت فوق می‌رسند. اگر در شکل کلونیه‌ها تغییر ناگهانی به وجود آمد و کناره کلونیه‌ها از حالت صاف به کاملاً مضرس تبدیل 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.

1- Plating Efficiency

می‌گذارد.

هر روز باید محیط کشت روی سلولهای بنیادی جنینی را تعویض نمود و هر دو روز یا حداکثر سه روز باید آنها

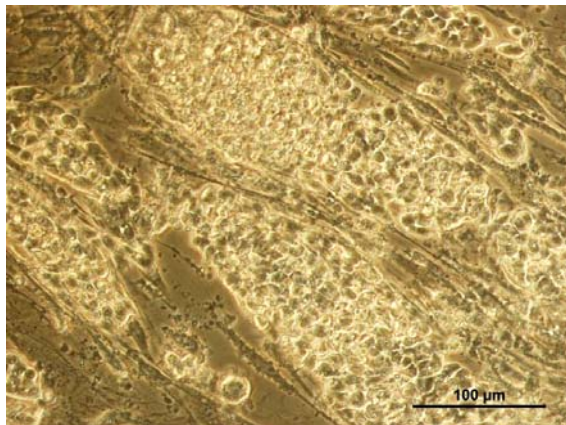
را پاساژ داد کیفیت محیط کشت آنقدر مهم است که در صورت نبود کیفیت مناسب، سلولهای بنیادی جنینی تمایز می‌یابند (شکل ۸).

جدول ۲. ترکیبات محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موشی

نام ماده	شرکت	شماره کاتالوگ	حجم (ml)
Knockout DMEM	Gibco	10829-018	۵۰۰
پنی سیلین - استرپتومایسین	Gibco	15140-148	۵
اسیدهای آمینه غیرضروری	Gibco	11140-035	۵
بتامراکتوتانل (1:1000)	Sigma	M7522	۰/۵
سرم جنین گاوی مخصوص کشت ^۱	Gibco	161141-079	۷۵

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

کوچک اضافه کنید (۲ دقیقه) 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



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 اندازه کلونیه‌ها 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+} بشوید (برای فلاسک کوچک ۵ ml و فلاسک بزرگ ۱۰ ml).
- ۳) PBS را بردارید و ۲ ml محلول PBS-EGTA به فلاسک

- ۴) به آرامی هر چه تمام محلول PBS-EGTA را بردارید.
- ۵) ۱ ml محلول Trypsin/EDTA اضافه کنید و ۳ 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 پپت کرد تا سوسپانسیون

محلول سرد باشد. تنها تفاوت آن است که به جای محیط کشت سلولهای تغذیه کننده از محیط کشت ES-DMEM که حاوی LIF (1000IU/ml) است، استفاده می شود.

(۱۲) ۱ ml از سوسپانسیون فوق را به هر ویال انجمادی اضافه کنید.

(۱۳) ویالها را به ظرف انجماد^۱ که از قبل در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری می شود، منتقل کنید و سپس ظرف مزبور را بلافاصله به فریزر (۷۰- درجه سانتی گراد) منتقل کنید.

(۱۴) 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 رده بنیادی 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 می شود. برای ذوب سلولهای بنیادی جنینی موشی کشت شده در یک فلاسک کوچک (۲۵ cm²) مراحل زیر را انجام دهید:

(۱) محیط کشت فلاسک را که از قبل با مایتومایسین C تیمار شده است برداشته و به جای آن ۷ ml محیط کشت ES-DMEM اضافه کنید.

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

تک سلولی از آنها به دست آید.

(۶) ۵ ml محیط ES-DMEM اضافه کنید و محتویات سلولی را پس از پیپت کردن به سه عدد فلاسک کوچک حاوی MEF تیمار شده با مایتومایسین منتقل کنید (هر فلاسک ۲ ml). محیط این فلاسکها را از قبل (ترجیحاً ۳-۴ ساعت قبل) با ۵ ml محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موشی تعویض کنید.

انجماد سلولهای بنیادی جنینی موشی

سلولهای بنیادی جنینی همراه با MEF منجمد می شوند به طوری که فلاسک کوچک ۲۵ cm² در سه ویال منجمد می شود. 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 ۲۵ cm² عبارتند از:

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

(۶) سوسپانسیون را به یک لوله منتقل کنید و ۲ ml دیگر محیط کشت ES-DMEM به فلاسک اضافه کنید و پس از شستشو، محتویات آن را به لوله اضافه نمایید.

(۷) سلولها را به مدت ۸ دقیقه و با دور rpm ۸۰۰ سانتریفوژ کنید.

(۸) سه ویال انجمادی (Nunc, ۲ ml) 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) ۳ ml محلول انجماد به لوله اضافه کنید و سلولها را پیپت کنید. نوع مواد و غلظت ترکیبات محلول انجماد سلولهای بنیادی جنینی شبیه MEF است که قبلاً بیان شده است و باید

1- Cryocooler

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

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

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

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

۷) روز بعد، محیط سلولها را تعویض نمایید.

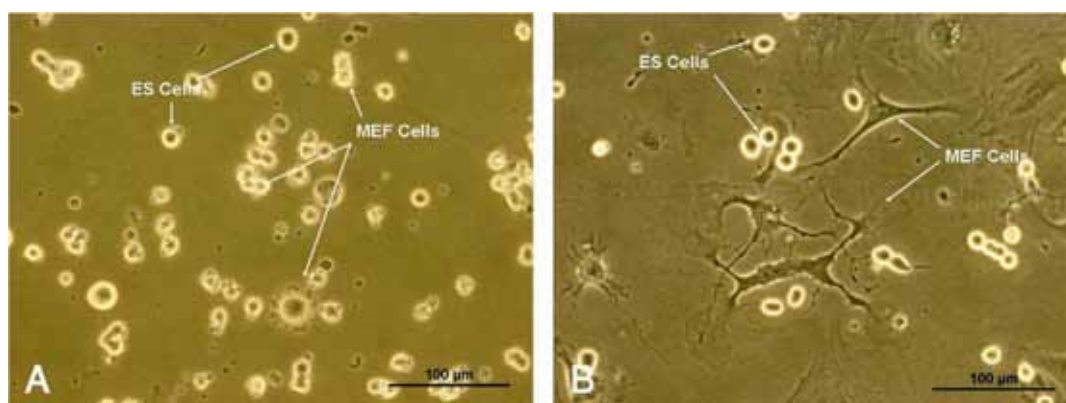
جداسازی سلولهای بنیادی جنینی از سلولهای

تغذیه کننده

به منظور انجام تمایز سلولهای بنیادی جنینی لازم است تا در ابتدا سلولهای بنیادی جنینی را از فیروبلاستهای جنین موش (MEF) جدا کرد. برای این منظور، مراحل زیر را به ترتیب انجام دهید:

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

۲) در انتها ۵ ml محیط کشت ES-DMEM به فلاسک کوچک اضافه کنید و محتویات سلولی را به خوبی پیست 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 و ۸ ml محیط کشت ES-DMEM به آن اضافه نمایید و سوسپانسیون را به هم بزنید تا توزیع سلولها یکنواخت باشد. زیر میکروسکوپ 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 برای ۱/۵ ساعت آن را بدون هرگونه حرکتی 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 به چسبیدن می‌کنند (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. جداسازی سلولهای بنیادی جنینی از MEF. (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

تفاوت سلولها دقت نمایید. سوسپانسیون سلولی رویی را با

۴) پتری را زیر میکروسکوپ فاز کنتراست نگاه کنید. به

باشند پاساژ در روز ششم هم ممکن است و برعکس اگر

کوچک باشند روز هشتم پاساژ داده می‌شوند.

قبل از انتقال کلونیاها 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 ۴ 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 - استرپتومایسین	Gibco	15140-148	۵
اسیدهای آمینه غیرضروری	Gibco	11140-035	۵
0.1M (1:1000) بتامرکاپتوتاتانل	Sigma	M7522	۰/۵
سرم جنین گاوی مخصوص کشت	Gibco	161141-079	۱۰۰
ITS	Gibco	41400-045	۵

محلول فوق در لوله‌های ۵۰ ml تقسیم‌بندی کنید و به هنگام استفاده ۵۰۰ ml ال - گلوتامین به هر لوله اضافه نمایید.

رتبه بندی کلونیهای hESC

جدول ۴ و شکل ۱۱، رتبه بندی کلونیها را نشان می‌دهد.

پیپت بردارید و به لوله‌ای منتقل کنید.

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

۶) لوله را با سرعت ۸۰۰ rpm 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 نظران را اضافه کنید.

پاساژ سلولهای بنیادی جنینی انسانی^۱

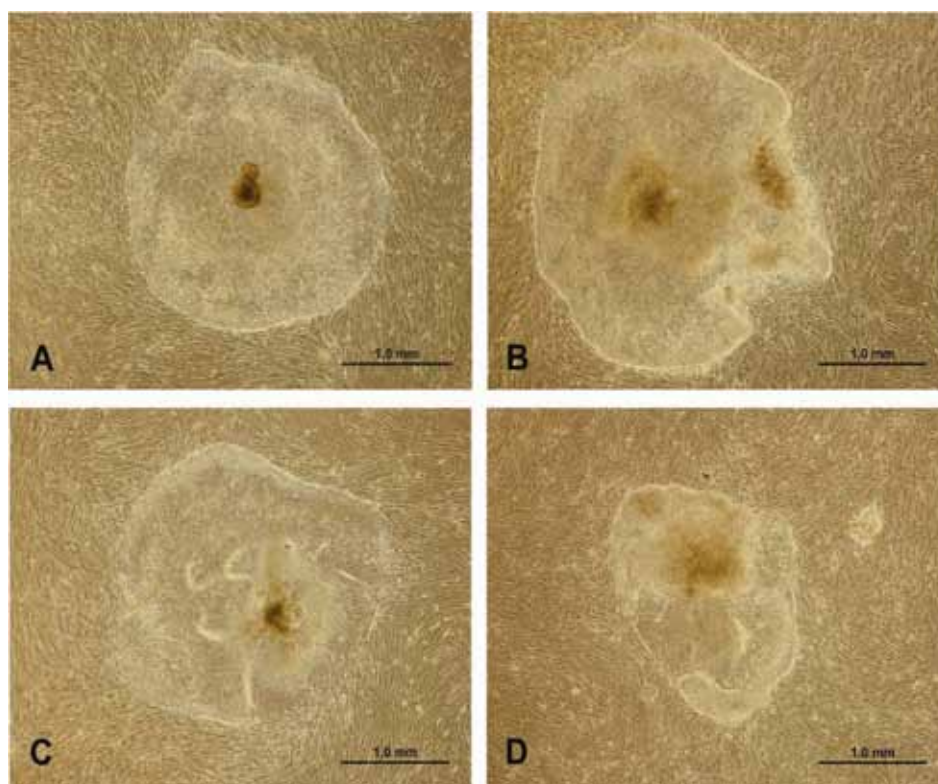
بسیاری از رده‌های hESC تولید شده با کلاژناز یا Dispase به همراه پراکنده کردن مکانیکی پاساژ داده می‌شوند.

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 کلونی‌های 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 قسمت‌های تمایز یافته کشتهایمان بیشتر دیده می‌شود از روش مکانیکی استفاده می‌کنیم و وقتی که کشت ما، سلولهای تمایز یافته کمتری داشت ما از روش آنزیمی برای پاساژ استفاده می‌کنیم. کلونیها معمولاً در روز هفتم یعنی وقتی که قطر آنها به حدود ۲-۱/۵ میلیمتر رسید پاساژ داده می‌شوند، البته اگر کلونیها خوب

1- Human Embryonic Stem Cells; hESCs

جدول ۴: رتبه بندی کلونیه های 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 ۶۰ درصد تمایز یافتگی شما می توانید از ۴۰ تا ۷۰ درصد از کلونی برای انتقال استفاده کنید
C متوسط	کلونی با حدود ۶۰ تا ۷۰ درصد تمایز یافتگی، معمولاً از این کلونیها برای انتقال استفاده نمی کنند اما اگر نیاز بود کمتر از ۴۰ 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 رشته ای، حبابی شکل یا حالت «تپه - دره» در آنها دیده می شود. این کلونیها کاملاً بی استفاده اند.



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

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 اندازه های یکسان در زمان برش بسیار مهم است، چراکه اگر قطعات کوچک باشند زمان بیشتری نیاز

درست کردن پیپت برای برش کلونیهای hESC

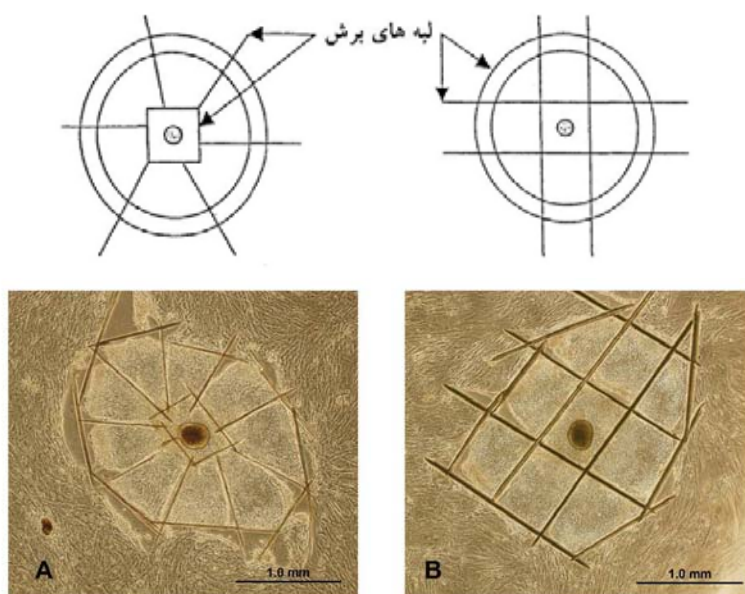
قطر پیپت پاستور ۱ میلیتر است که باید با کشیدن آن روی شعله این اندازه را به حدود ۰/۲۵ میلیتر برسانید تا قادر باشید با ظرافت کلونیه را برش بزنید. باید توجه داشت که اگر نوک پیپت خیلی دراز و نازک باشد هنگام برش کلونی



شکل ۱۲. مراحل درست کردن پیپت برای برش کلونیهای hESC

است که به اندازه ای رشد کنند که قابل پاساژ شود و همچنین اگر قطعات بزرگ باشند درانتقال آنها با پیپت به مشکل بر می خورید. باید توجه داشت که سلولهای تغذیه کننده (MEF)، تاحد امکان از قطعات کلونی باید جدا شوند.

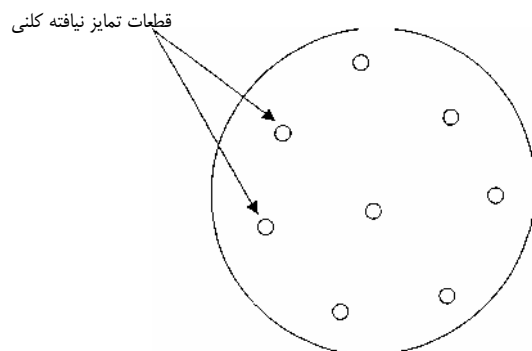
می شکند و همچنین نوک خیلی ضخیم باعث پاره شدن کلونی و عدم تسلط ما به برش می شود. نوک پیپت باید طوری شکسته شود که یک لبه نسبتاً کوتاه، بدون دندان و تیز ایجاد کند (مراحل ساخت در شکل ۱۳ نشان داده شده است).



شبهه مانند چرخ مانند

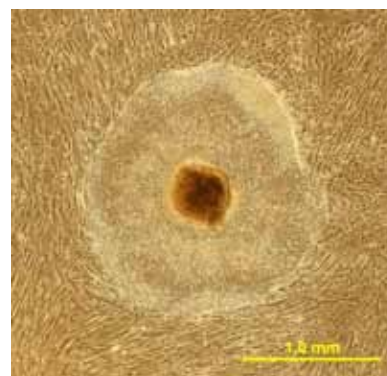
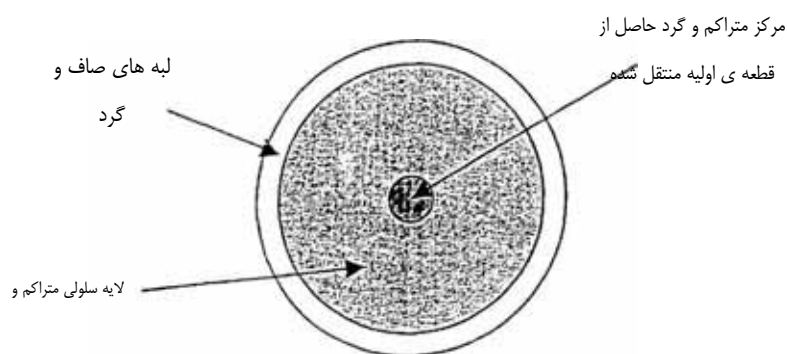
شکل ۱۳. برش زدن کلونیهای hESC

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



شکل ۱۵. نمای شماتیک و عکس میکروسکوپ معکوس از یک کلونی سلولهای بنیادی جنینی انسانی

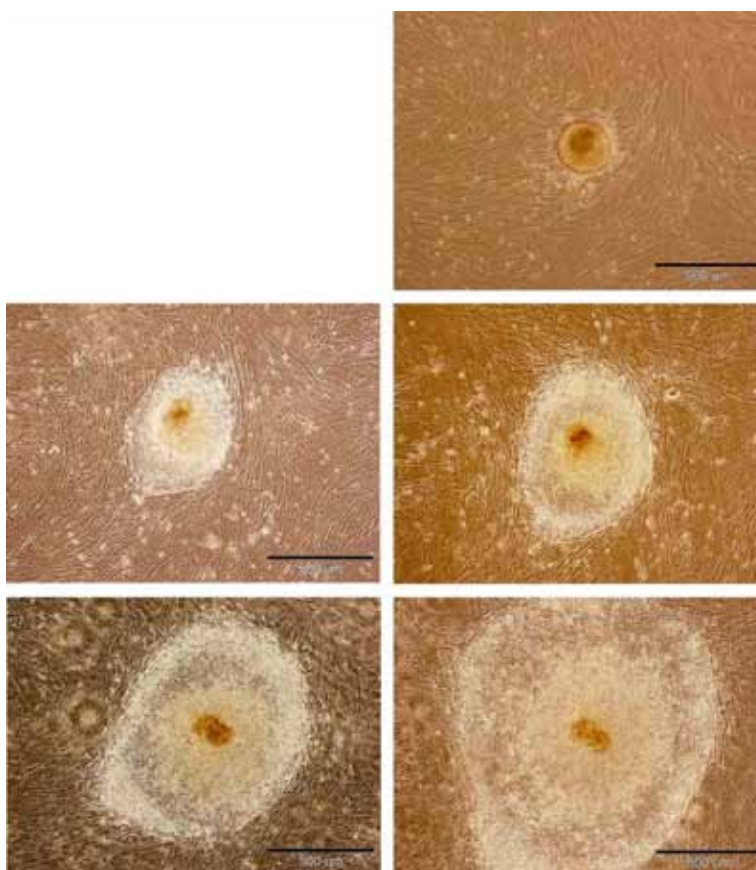
اول تا روز انتقال بعدی آورده شده است.

شکل ظاهری کلونیه‌ها بعد از انتقال

در جدول ۶، مشخصات کلونیهای hESC بعد از انتقال، از روز

جدول ۶. مشخصات کلونیه‌های 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 کاملاً 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 می دهند که تا حدودی مشخص است. کلونی ها در این روز خیلی تپیک نیستند و ممکن است سالم به نظر نرسند.
۴	بعضی کلونی ها همچنان به حالت توصیف شده در روز قبل هستند ، در صورتی که کلونی ها ی دیگر مورفولوژی یک کلونی مشخص (تپیک) را نشان می دهند ، اگر چه همچنان کوچک می باشند.
۵	کلونی ها مورفولوژی طبیعی خودشان را که شامل کناره های مشخص و مرکز متراکم تر حاصل از قطعه اولیه کلونی است نشان می دهد. معمولاً سلولهایی که در ناحیه بین قسمت لبه ها و قسمت مرکزی هستند نازک به نظر می رسند. کلونی ها در این روز تاحدودی کوچک هستند.
۶	کلونی بسته به رده سلولی آماده انتقال است. باید توجه داشت که کلونی ها ممکن است هنوز کوچک باشند و تراکم کمتری نسبت به کلونی در روز هفتم داشته باشند.
۷	روز اول انتقال (پاساژ)



شکل ۱۵. ظاهر کلونیه‌ها بعد از انتقال

مخصوص آلومینیومی^۴ قرار داده و آن را داخل یک ظرف در باز حاوی نیتروژن مایع بگذارید. (در مراحل بعدی اهمیت این کار معلوم می شود)

انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی به روش انجماد شیشه‌ای

hESC/ HEPES

۱) HEPES 1M ۲۵۰ μl

۲) hESC ۱۰ ml

۳) Combine, store ۴ °C

1M Sucrose media:

این محلول ترکیبی از محلول انجماد شیشه‌ای است.

۱) Sucrose ۱/۷۱ gr

۲) hESC/HEPES ۴ ml

۳) Warm ۳۷ °C

۴) Up to 5ml with hESC/HEPES

۵) Filter

۶) Store at 4°C , 1 week

محلول انجماد شیشه‌ای ۱۰٪

۱) hESC/HEPES ۲ml

۲) Ethylene Glycol ۰/۲۵ ml

۳) DMSO ۰/۲۵ml

۴) Combine, store at 4°C, 1 day

محلول انجماد شیشه‌ای ۲۰٪

۱) hESC/ HEPES ۷۵۰ μl

۲) Sucrose ۷۵۰ μl

۳) Ethylene Glycol ۵۰۰ μl

۴) DMSO ۵۰۰ μl

۵) Combine, store at 4°C, 1 day

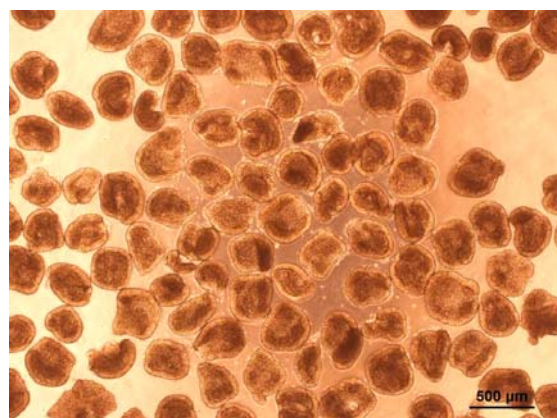
انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی

انجماد سلولهای بنیادی جنینی انسانی به دو روش انجام می شود: انجماد شیشه‌ای^۱ و انجماد ویالی^۲

الف) روش انجماد شیشه‌ای

از این روش برای انجماد سلولهایی که روی MEF کشت شده اند استفاده می شود. برای انجام این روش به صورت زیر اقدام کنید: محلولهای ذوب و انجماد را طبق مقادیری که در بخشهای مربوطه آورده شده اند آماده کنید ، نکات مربوط به ترکیبات و استفاده از آنها در متن آورده شده است.

ابتدا باید کلونیه‌ها را به قطعاتی که اندکی بزرگتر از برشهای مربوط به پاساژ هستند، برش دهید و سپس توسط سمپلر این قطعات را کنده و در چاهک شماره ۱ پلیت چهار خانه قرار دهید (شکل ۱۷).



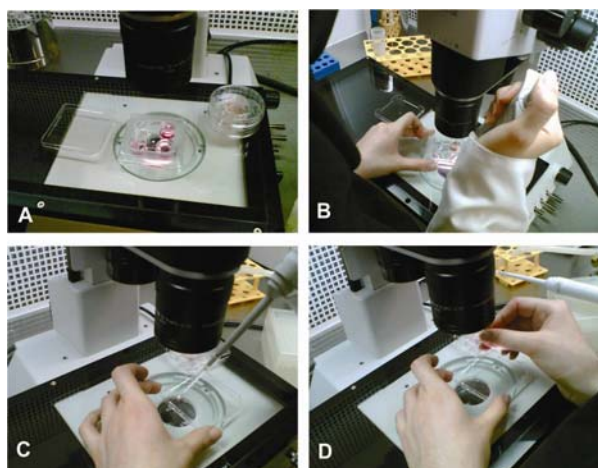
شکل ۱۷. قطعات حاصل از برش کلونیه‌های سلولهای بنیادی جنینی انسانی

یک ویال مخصوص انجماد^۳ ۵ میلی لیتری بردارید، مشخصات رده سلولی را که قرار است منجمد شود روی آن بنویسید و به وسیله یک سر سوزن ۱۸ G که روی شعله داغ کرده اید چهار سوراخ در قسمت بالا و چهار سوراخ 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

1- Vitrification
2- Cryopreservation
3- Cryovial

4- Cryocane

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 ۴۵ درجه وارد نیتروژن مایع کنید و بعد آنها را در ویال انجماد که از قبل آماده کرده‌ید نگهداری کنید. شکل ۱۷ بخشی از کار را نشان می‌دهند.



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 4°C, 1 day

0.1M sucrose

۱) hESC/HEPES ۲/۲۵ ml

۲) Sucrose 1M ۰/۲۵ ml

۳) Combine, store at 4°C, 1 day

۱) ۰/۲M ۱'	۲) ۰/۱M ۵'
۳) hESC/HEPES Medium, ۵'	۴) hESC/HEPES Medium ۵'

ظرف چهارخانه

hESC/HEPES
Sucrose 1M

۱)	۲) محیط hESC/HEPES
۳) ۱۰٪ VS ۱'	۴) ۲۰٪ VS ۲۵"

ظرف چهارخانه

۱- محیط انسانی حاوی HEPES، ۱ مولار (HEPES) در اینجا در پایدار ماندن PH در محیط کمک می‌کند. 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 (شکل ۱۸-۱۸A).

۲- محیط انجماد ۱۰ درصد: (۱ میلی لیتر از آن را داخل چاهک شماره ۳ بریزید) سمپلر را در کمترین مقدار ممکن که می‌توانید به راحتی ۸ تا ۱۰ کلونی به آن منتقل کنید تنظیم کرده (حدود ۱۰ μl) و با 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 و در ضمن در هر انتقال سرسمپلر عوض شود. قطعات منتقل شده به این محیط به علت ویسکوزیته بالا به حالت چرخان در می‌آیند و پخش می‌شوند که باید توسط ضربات نوک سر سمپلر به قطعات آنها را در محیط غوطه‌ور کرده و در کف ظرف جمع کنید.

۳- محیط انجماد ۲۰ درصد: (۱ میلی لیتر داخل چاهک شماره ۴ بریزید) قطعات داخل چاهک قبلی را با همان دقت به این محیط منتقل کنید و ۲۵ ثانیه زمان بگیرید (شکل ۱۷-۱۷B). در اینجا نیز به علت ویسکوزیته بالا همان مشکل پخش شدن و در سطح قرار گرفتن کلونی‌ها را دارید که باید دقت داشت و همانطور که گفته شد قطعات را غوطه‌ور 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 هیتربا دمای ۱۵۰°C کشیده‌اید و قطر آن را نازک‌تر کرده‌اید) قطعات را جمع کنید (شکل ۱۷-۱۷C و D). توجه داشته باشید که باید نی انجماد را در زاویه ۳۰ درجه با قطعات تماس دهید تا طبق خاصیت موئینگی این قطعات به

محلول ذوب

پس از آماده کردن محلولها به صورت زیر عمل 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^۱ یکی از نی‌ها را برداشته و با کمک انگشت شصت و انگشت وسط نی را با سرعت از نیتروژن خارج کرده و به داخل چاهک اولی که TS ۲۰ 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 ۲۰ درصد شود. یک دقیقه زمان بگیرید (شکل ۱۹- B).

نکته: باید توجه داشت که حتماً از عینک ایمنی در این 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 می‌پرد.

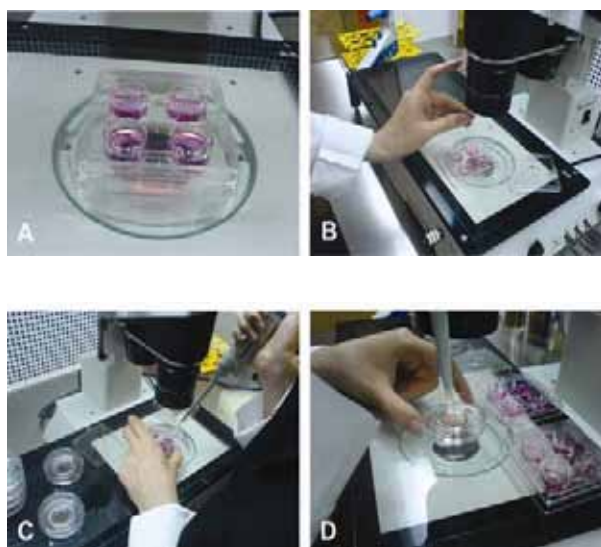
قطعات را بعد از ۱ دقیقه زمان جمع کرده به داخل محیط دوم که حاوی 0.1 M سوکروز است ببرید و ۵ دقیقه زمان بگیرید (شکل ۱۹- C).

این قطعات را در داخل چاهک های شماره ۳ و ۴ 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 (شکل ۱۹- D).

کشت، پاساژ و انجماد hESC در شرایط عاری از سلولهای تغذیه کننده^۲

در راستای کاربردی کردن سلولهای بنیادی جنینی انسانی،

گروههای تحقیقاتی مختلفی در سراسر دنیا در حال کشت این سلولها در شرایط عاری از هر گونه مشتقات حیوانی^۳ هستند که تاکنون به موفقیت هایی در این زمینه دست یافته اند [۶].



شکل ۱۹. 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^۴، و همچنین به جای سرم جنین گاوی از یک سرم تجاری به نام Knockout serum Replacement استفاده می‌شود، که تقریباً تمام ترکیباتش به غیر از ترکیبات ناشناخته ای که در فرایند استخراج و خالص سازی آلبومین همراه آن می‌آیند 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 در آن از لامینین و فیبرونکتین انسانی به جای ماتریژل که از یک سارکومای موشی به دست می‌آید و منبع حیوانی دارد و همچنین استفاده از آلبومین انسانی در

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

1- Forceps
2- Feeder Free Culture

ترکیب سرم بوده است).

مدت ماتریژل را بکشید و با PBS+ کف ظرف را شستشو دهید و بعد محیط کشت سلول را اضافه کنید.

استفاده از ماتریژل

کشت و پاساژ

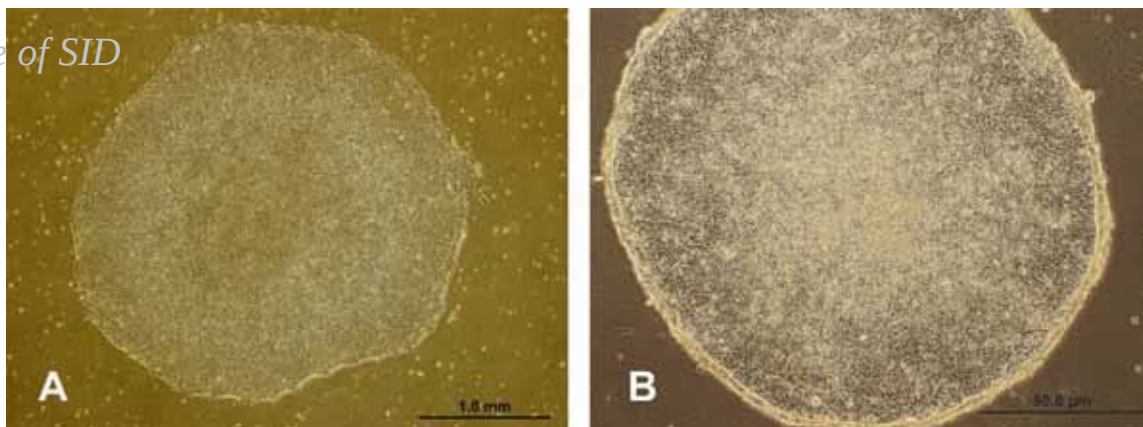
کلونیهای ۷ روز کشت شده را پس از دو بار شستشو با PBS+ به وسیله آنزیم کلاژناز نوع IV (به مدت ۶ الی ۸ دقیقه) و به کمک Cell Scraper جمع کنید و به یک لوله سانتریفوژ منتقل کنید. پس از ته نشین شدن قطعات کلونی، محلول رویی که حاوی سلولهای تک شده یا قطعات بسیار ریز است به گونه ای جدا کنید که حدود ۲۰۰ µl از آن 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 تا ۱۰۰ سلولی مناسباند). این قطعات را به ظرفهایی که از قبل با ماتریژل کف آنها را پوشاندهاید منتقل کنید (جدول ۶ و شکل ۲۰).

ماتریژل با رقت نهایی ۱/۳۰ استفاده می شود، برای این کار ظرف اصلی ماتریژل را که در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شود، به مدت ۲۴ ساعت در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگه دارید تا ذوب شود (دقت داشته باشید که ماتریژل در دمای اتاق به ژل تبدیل می شود که قابل استفاده ناست)، سپس بامحیط DMEM/F-12 به نسبت ۱/۲ رقیق کنید و به میزان مورد استفاده در ویالها تقسیم بندی کنید و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کنید زمان استفاده این ویال را در ۴ 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 و ۲ الی ۳ ساعت صبر کنید. بعد از این

جدول ۶. 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	۲۰۰ µl (from 100mM Stock)
۶) Pen/strep	۱۰۰ U/ml penicillin and ۱۰۰ µg/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	۴۰ ng/ml	۳۲۰ µl

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 بعد از تیمار با آنزیم کلاژناز نوع IV

انجماد ویالی

در ابتدا محلول انجماد را آماده کنید:

۱- محیط کشت: ۴۰ درصد، ۲- ko/SR : ۵۰ درصد، ۳- DMSO : ۱۰ درصد

۴-ml آنزیم کلاژناز IV روی سلولهای کشت شده (در اینجا ظرف ۱۰cm) بریزید و ۶ الی ۸ دقیقه زمان بگیرید. سپس دوبار با PBS+ شستشو دهید و با استفاده از یک Cell Scraper کلونیه‌ها 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 کلونیه‌ها تکه تکه شوند.

سپس به آرامی محلول انجماد را به سلولها اضافه کنید. (برای هر ویال ۲۰۰ μl سوسپانسیون) ویال را به فریزر -۷۰- درجه سانتی گراد منتقل کنید و بعد از ۲۴ 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 بشوید و محتویات آن را زیر هود به ۴ml محیط کشت (بدون فاکتورهای رشد) اضافه کنید و ۱ دقیقه با دور ۱۰۰۰rpm سانتریفوژ کنید بعد قطعات ته نشین شده را به ظرف کشت ماتریزله 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 و پرتوانی سلولهای بنیادی جنینی

بعد از تولید اولین رده سلولهای hES در سال ۱۹۹۸، تا کنون تعداد زیادی (حدود ۴۱۴) رده از بلاستوسیستهای انسانی تولید شده است. روشهای تولید و نگهداری 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 الی و تغییرات مرتبط با تکثیر طولانی مدت در محیط آزمایشگاهی. این اختلافات ممکن است منوط به

تنوع ژنتیکی ذاتی نمونه انسانی باشد و از طرفی دیده شده که یک رده تحت شرایط مختلف کشت و یا 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.

جدول ۸. منابع تنوع در میان سلولهای بنیادی جنینی انسانی

تفاوت به علت	تنوع ژنتیکی
منشاء رده سلول	مرحله ای از بلاستوسیت که رده از آن مشتق می شود شرایط کشت اولیه (لایه مغذی، شرایط کشت) نشانه گذاری و غیر فعال شدن کروموزوم X
تفاوت به علت کشتهای طولانی مدت	تغییرات ژنتیکی (از دست دادن یا بدست آوردن توالی ویژه) تغییرات عمومی و تخصصی اپی ژنتیکی (متیلاسیون DNA و استیلاسیون هیستون)
تفاوت به علت موزایسم	تمایز کلی و جزئی در جمعیت های 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	+	+
گیرنده LIF	+	-/+
فعالیت تلومرایی	+	+
تنظیم خودنوزایی	از طریق رسپتورهای gp 130 لایه تغذیه کننده MEF	سلولهای تغذیه کننده (MEF) یا سلولهای انسانی (سرم، ماتریکل، bFGF)
خصوصیات رشد in vitro	Nanog, BMP-4	
تشکیل EB	EBهای ساده و کیستی	EBهای کیستی
تشکیل Teratomas در vivo	+	+

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 hES ها پرتوانی یکسانی دارند؟
ارزیابی توانایی تمایز
آیا hESC ها 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 و شاخص سلولهای hES باشد بسیار مهم و مانع خطا در روند کار می شود. یکی از متداولترین روشها، تعیین نقشه ژنتیکی STR^۲ 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^۳ در هر نمونه، اطلاعات صحیحی راجع به تنوع اللی یا انحراف در بین تعداد زیادی از رده های سلولی hES 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 با استفاده از سلولهای بنیادی

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. اهمیت 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^۱ 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 الهای 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 و کشت 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 سلولهای hES را به اشتراک بگذارند.

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

2- Single Tandem Repeat
3- Single Nucleotide Polymorphism

1- International Stem Cell Initiative

سوماتیک مثل سلولهای بنیادی هماتوپوئیتیک که به تکثیر محدود و دستکاری کمی در محیط آزمایشگاهی نیاز دارد، در درمان با سلولهای hES 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 سلولی hES 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 و تبدیل هیستونی
• غیرفعال شدن کروموزوم X

در کنار استفاده از شاخصهای سلولهای غیر تمایزی از قبیل ژنهای مرحله غیر تمایزی و آنتی 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 مارکهای 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 کشتهای 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 رشد 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] و سلولهای ES موشی [۱۲] مشاهده شده که آن را می توان به سلولهای hES هم تعمیم داد. در نتیجه، سنجش بیان ژنهای کلیدی (مثل، تلومراز، مارکهای ویژه چرخه سلولی) (پایداری ژنومی و کیفیت 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 جایی های بزرگ، به راحتی با انجام کاریوتیپ قابل تشخیص هستند. بهترین قدرت تفکیک^۱ در سیتوژنتیک تا حد ۱۰Mb است برای تعیین تغییرات کوچکتر نقشه SNP، CNP^۲، 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 هتروژنیسی (ناهمگونی) و توانایی تمایز

ارزیابیهای فوق الذکر سنجش توانایی خود نوزایی سلولها و

1- Resolution

2- Copy Number Polymorphism

پروتئینی در حال توسعه در آزمایشگاههای تحقیقاتی است. آزمونهای نهایی پرتوانی، ارزیابی بیولوژیکی تمایز است مثل آنالیز الکتروفیز یولوژی نورون و ماهیچه، آنالیزهای هیستولوژی تراتوما مشتق شده از پیوند سلولهای hES. نکات قابل توجه در این ارزیابیها عبارتند از:

۱- عدم توافق همگانی در استفاده از مارکرها، معمولاً مارکری 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 مارکهای استاندارد که توسط مجامع علمی و بین المللی 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 سلولهای hES نرمال، یک رده سلولهای hES که به لحاظ کاریوتیپ غیر طبیعی است و یک رده سلولی ترانوکاریوتوما را بر شمرده است. در حالی که انتشار اطلاعات مربوط به ۲۰-۱۰ رده یک نقشه معقوله است ولی اجرا کردن این استراتژی بسیار مشکل است. از جمله مشکلات می توان به موارد زیر اشاره نمود: توافق عمومی بر انتخاب روش معقوله، شناسایی رده هایی که به عنوان استاندارد قابل استفاده باشند و شناسایی گروهی یا آزاتسی که بودجه این تلاشها را تأمین کند و ملزم به اجرای این استانداردها کند [۸].

پایداری آنها در طول کشت را نشان میدهد. گرچه به علت تعادل ظریف بین پرتوانی و تمایز 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 آلی 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 جدول ۱۱ توصیف شده در برگیرنده روشهای ارزیابی تمایز خود به خودی و پرتوانی است.

جدول ۱۱. ارزیابی ناهمگونی و توانایی 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 ارزاتر می باشند گرچه دقت کمتری دارد. روشهای مولکولی دیگر از قبیل تعیین پروفایل میکرو RNA و سنجشهای

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 استاندارد که در NIH ثبت شده است و یا مشتقات جدیدتر • نیازمندیهای کشت پیچیده است • ناپایداری در کشت • ارزش بالایی سلولهای حاصل • اداره ثبت رده های سلولی آمریکا، اجازه توزیع رایگان سلولهای hESC نرمال را در سطح آمریکاممنوع کرده است
وارسته هایی از سلولهای hES که کاربوتایپ 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 از سلولهای hES	• 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 شرایط G.M.P¹ 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

- 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

(ضمیمه ۱) وسایل مورد نیاز

۱) هود لامینار کلاس I و II مجهز به لامپ UV، ۲) انکوباتور (درصد ۵ CO₂، درجه سانتی گراد ۳۷ و رطوبت ۹۵ درصد)،

۳) میکروسکوپ فاز کنتراست معکوس، ۴) میکروسکوپ استریو با سیستم نورپردازی گذاره

۵) تانک نیتروژن مایع، ۶) سانتیفیوژ معمولی، ۷) بن ماری

۸) فریزردرجه سانتی گراد ۷۰ - ودرجه سانتی گراد ۲۰ - و یخچال معمولی درجه سانتی گراد ۴

۹) ترازو با دقت حداقل ۰/۱ میلی گرم، ۱۰) کیسول CO₂

۱۱) میکروسکوپ الکترونی گذاره^۱، ۱۲) پمپ خلا، ۱۳) پیت دهانی

۱۴) سمپلرهای متغیر ۰.۵-۱۰ μl، ۱۰-۱۰۰ μl، ۱۰۰-۱۰۰۰ μl

۱۵) سمپلر متغیر چندکاناله ۱۰-۲۰۰ μl، ۱۶) میکروسکوپ فلورسنس و دوربین، ۱۷) لام شمارش سلول (هموسایتومتر)

1- Transmitted

Archive of SID (ضمیمه ۲) مواد مورد نیاز

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 (β-ME)	M7522	Sigma
Mitomycin C	M0503	Sigma
Guinea Pig complement	1919	IMVS Veterinar y 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
NaHCo ₃	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

برای افزایش نیمه عمر آن ویال اصلی تا زمان استفاده بصورت منجمد نگهداری شد. هنگام استفاده، ابتدا محتویات ویال اصلی به ۱۰ ویال ۱۰۰ μl، ۱۰۷ IU تقسیم شد. و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید و هنگام مصرف ۹۰۰ μl PBS بدون Ca^{2+} و Mg^{2+} به آن اضافه شد غلظت حاصل ۱۰۶ IU شد. ویال مذکور در ۴ درجه سانتیگراد قابل نگهداری است.

محلول EGTA ۱۰۰× (stock)

(۱) ۹۵۱ mg EGTA را وزن کنید.

(۲) ۴۹/۴ میلی لیتر آب فاقد یون به آن اضافه نمایید.

(۳) مقدار ۶۰۰ μl از محلول ۱۰ M سود به آن اضافه نمایید (pH=8) تا حل شود.

(۴) محلول فوق را با فیلتر ۰/۲۲ μl فیلتر نمایید

(۵) در دمای اتاق نگهداری کنید.

(۶) این محلول ۵۰ mM و با غلظت ۱۰۰× است.

محلول PBS-EGTA ۱× (working)

۰/۵ ml از محلول EGTA (۵۰ mM) ۱۰۰× را برداشته و ۴۹/۵ ml

از محلول PBS فاقد Ca^{2+} و Mg^{2+} (pH=7.5) اضافه نمایید.

(ضمیمه ۳) ظروف و وسایل مصرفی

شرکت	وسایل مصرفی
Flacon & TPP	Tissue culture flasks (25,75,150cm2)
Supa	Syringe (1ml)
Treff	Pipette Tips (1000ml)
Nunc	Rack & storage
Nunc	Test plates (4-well)
TPP	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
Flacon&TPP	Tissue culture dishes
Flacon	Tissue culture central well
TPP	Cell scrapers
Nunk&TPP	Cryo tubes
TPP	Cryo box
TPP	Rack&Storage

اسیدهای آمینه غیرضروری MEM

اسیدهای آمینه غیرضروری MEM در جدول زیر ذکر شده، غلظت نهایی مورد استفاده ۰/۱ mM است. اسیدهای آمینه به صورت مخلوط و ۱۰۰× (۱۰ mM) قابل خریداری هستند. این محلول در ۴ درجه سانتیگراد قابل نگهداری است ولی می توان برای افزایش نیمه عمر آن را در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری نمود.

اسیدهای آمینه غیرضروری MEM

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 آنتی اکسیدان به محیط کشت اضافه می شود. غلظت نهایی مورد استفاده ۰/۱ mM (۰/۱-۴ M) است. لازم به ذکر است که محلول Sigma آن ۱۴ M است. بنابراین با افزودن ۷۰ μl از آن به ۱۰ ml از PBS محلول ذخیره ۰/۱ M ساخته می شود. به هنگام استفاده محلول ذخیره ۰/۱ M باید ۱۰۰۰ برابر رقیق شود.

پنی سیلین - استرپتومایسین

پنی سیلین و استرپتومایسین به ترتیب با غلظت ۵۰ IU/ml و ۵۰ μg/ml مورد استفاده قرار می گیرد. محلول ذخیره آن با غلظت ۱۰۰× است و هنگام استفاده باید صد برابر رقیق شود. محلول ذخیره به صورت تقسیم بندی شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شود.

فاکتور ممانعت کننده لوکمیایی (LIF)

در این طرح از LIF (Chemicon, ESGRO, 107IU) استفاده شد.

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.

ضمیمه ۴ طرز ساخت اسید تایرود

آماده سازی محلول اسید تایرود برای حذف ناحیه شفاف

نام ماده	gr/100 ml
NaCl	0.8
KCl	0.02
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.024
MgCl ₂ .6H ₂ O	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. **Vítezslav 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.