طرق زراعة الخلايا المعلقة Suspension culture methods

هناك طرقتّين رئيستّين لزراعة الخلاّيا المعلقة وهي :

١. الزراعة الكمّية Batch culture :

عبارة عن نظام مغلق لتنمّية الخلاّيا المعلقة، حّيث تنمى الخلاّيا فَي حجم ثابت من الوسط الغذائي السائل المتحرك وذلك لضمان التوزّيع المنتظم للخلاّيا الحرة وكتل الخلاّيا فيَ الوسط ولتحفّيز تبادل غازي جّيد بّين وسط الزراعة والهواء.

تنمى معلقات الخلاّيا فَي دوارق معينه تحتوي على وسط غذائي سائل، ويتم اكثار المزارع روتينياً بأخذ كمّية قلّيلة من المعلق الخلوي وتنقل الى وسط غذائَي جدّيد.

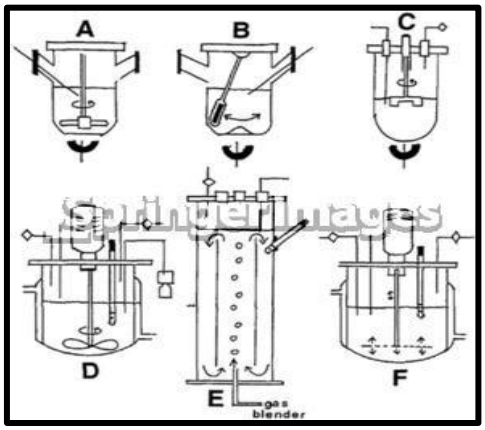
يلاحظ ان نمو كتلة الخلاّيا الحّية Biomass فَي هذه المزارع تأخذ منحنى النمو الثابت المار بفترات التباطؤ او الركود او التأقلم فَي النمو وذلك لاقلمة الخلاّيا على البّيئة الجدّيدة وتعتمد هذه المرحلة اساساً على حالة نمو المزرعة الاصل خلال وقت اعادة الزراعة وحجم اللقاح الابتدائَي المستخدم، وّيمكن ان تقلّل فترة التباطؤ فَي النمو بإضافة وسط غذائَي مكّيف الى الوسط الزراعَي الغذائَي المستخدم، ثم تمر الخلاّيا المزروعة بمرحلة النمو الاسَي الذي تنقسم فّيه الخلاّيا بسرعة والتَي تعتمد على حّيوّية الخلاّيا المستعملة ثم مرحلة النمو الخطَي الذي تستمر فّيه بالانقسام بشكل ثابت تقريباً ، ثم تصل الخلاّيا الى مراحل انخفاض معدل النمو مارة بمرحلة الثبات وهَي المرحلة المناسبة لإعادة الزراعة، ثم تتوقف الخلاّيا عن النمو لاستنفاذ المواد الغذائّية وتراكم المواد الأّيضّية الضارة بنمو الخلاّيا.

واعتماداً على الطريقة المستعملة لتحرّيك الوسط السائل فَي وعاء الزراعة تقسم الزراعة الكمّية الى:

A. المزارع ذات الدوران البطَيء Slowly rotating cultures

قام الباحث Steward و Shanz فَي 1956 بتصمّيم دوارق تستعمل لزراعة الخلاّيا الحرة والكتل الخلوّية الصغّيرة تسمى بالدوارق ذات الحلم او الزوائد Nipple flask تثبت هذه الدوارق على قرص ّيدور بشكل عامودي على المحور الافقَي بسرعة بطّيئة (1-2 دورة/ دقّيقة) وبذلك تتناوب الخلاّيا الموجودة فَي الدورق تارة بالغطس فَي الوسط وتارة اخرى الى الهواء الموجود فَي الدوارق.

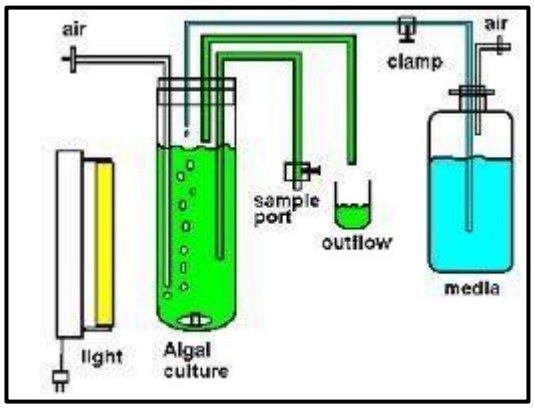
B. المزارع الاهتزازّية Shaking cultures



هذا النظام ابسط بكثّير من النظام السابق وبنفس فعالّيته، إذ توضع الدوارق الحاوّية على مزارع المعلقة فَي دوارق على منصة ذات حركة دائرّية بسرعة دوران تتراوح بّين 40-170 دوره/دقّيقة .

C. المزارع المتهّيجة Stirred cultures

يمتاز هذا النظام بثبات الوعاء الحاوي على الوسط والخلاّيا وّيتم المحافظة على انتشار الخلاّيا والتبادل الغازي داخل وسط الزراعة السائل بواسطة حقن فقاعات هوائّية داخل



الوسط الغذائي او باستعمال قضّيب مغناطّيسً صغّير يّدور داخل الوعاء.

٢- المزارع المستمرة Continuous cultures

تختلف الزراعة المستمرة عن الزراعة الكمّية وذلك بتنمّية المزارع المعلقة بأعداد كبّيرة فيً حالة ثابتة ولفترات طوّيلة بإضافة اوساط غذائّية جدّيدة وسحب كمّيات متساوّية من الوسط الغذائًي المستعمل. **يوجد نوعان من الزراعة المستمرة هما:**

- **المزارع المستمرة المغلقة Closed Continuous cultures**

وفّيها ّيوازن تدفق الوسط الغذائًي القدّيم مع الوسط الغذائي المضاف فضلا عن ذلك فان الخلاّيا الموجودة فًي الوسط الغذائًي القدّيم تعزل وتضاف الى وسط الزراعة

الياً لذى فان الكتلة الحّيوّية تستمر فًي الزّيادة لاستمرار نمو الخلاّيا وانقسامها.

- **المزارع المستمرة المفتوحة Open continuous cultures**

فًي هذا النوع ّيصاحب انسّياب الوسط الجدّيد الى الداخل بخروج حجم مساوي له من الوسط الغذائي القدّيم مع الخلاّيا دون اعادتها ثانّيتاً الى الوسط، وّيمكن من خلال تنظّيم معدل انسّياب الوسط وغلقة بان نسمح ببقاء المعلقات الخلوّية فًي حالة الطور الاسًي.

معدل نمو الخلايا وفعالياتها الايضية Growth and metabolic activities of cultured cells

يعتمد معدل نمو الخلاّيا النباتّية فًي النسّيج النباتًي على قابلّية خلاّياه لبناء المركبات الاساسّية لدّيمومة الانقسام والنمو. تتضمن عملّية النمو عدة مراحل هًي مرحلة البناء والتوسع ومرحلة الاستطالة ثم الانقسام، وبالامكان قّياس معدل النمو للخلاّيا المعلقة والنامّية فًي وسط معّين بعدة طرق منها:

١. **حساب الخلاّيا Cell number** : يّعد حساب عدد الخلايا فًي المزارع الخلوية مؤشراً على نموها وفعالّيتها فًي الوسط الغذائي وّيمكن عد الخلاّيا باستعمال cell counter التًي تستعمل فيً عد خلاّيا الدم.

٢. **حساب حجم الخلاّيا Cell volume** : وعادة تقدر بحجم الخلاّيا الموجودة فًي 1 سم^3 من الوسط بعد ترسّيبها بطرّيقة الطرد المركزي.

٣. **الوزن الطري للخلاّيا Fresh weight of the cell** : لا تعد هذه الطريقة مؤشراً جّيداً نسبة الى امتصاص المواد الغذائّية من الوسط الغذائًي، ولكن يّمكن اعتمادها مؤشراً، إذ ّيتم فصل الخلاّيا من الوسط ثم تجفف الخلاّيا بواسطة الترشّيح والضغط وّيتم بعدها حساب الوزن الطري للخلاّيا.

٤. **الوزن الجاف للخلاّيا Dry weight of the cells** : تعد طرّيقة مثلى فًي تحدّيد نمو الخلاّيا فًي المزارع الخلوّية وتستعمل نفس الخطوات فًي طرّيقة الوزن الطري، الا ان التجفّيف ّيتم بواسطة الحرارة 60- 70م ولمدة 12- 24 ساعة ثم ّيقاس وزن الخلاّيا لكل/ سم^3 من الوسط الغذائي .

٥. **محتوى البروتّين الكلّي للخلاّيا Protein content of the cells** : هناك طرق عدة لتقدّير كمّية البروتّين الكلّي فّي الخلاّيا النباتّية من اهمها طرّيقة كلدال وطرّيقة الفولّين والتيً من خلالها ّيمكن تحدّيد قابلية الخلايا على بناء البروتّين التّي تعد مؤشراً على نمو الخلاّيا.

٦. **محتوى الخلاّيا من DNA DNA content of the cell's** : يّمكن استخدامها فّي تقدّير معدل النمو للخلاّيا المعلقة على اساس قابلّية الخلاّيا على بناء الحوامض النووّية، لان زّيادة كمّية الـ DNA خلال فترة زمنّية معينة ّيعد مؤشراً على نمو وانقسام الخلايا فّي المزارع الخلوّية، وتعد هذه الطرّق المفضلة فيً عملّية تحدّيد نمو الخلاّيا.

الأجسام المضادة وحيدة النسيلة (Monoclonal antibody):-

الأجسام المضادة وحيدة النسيلة هو نوع خاص من الجزئيات البروتينية ينتج في المختبر. هنالك أنواع من المضاد الوحيد النسيلة، تنتجها ـ بصورة طبيعية ـ أجهزة المناعة في الإنسان والحيوان، عندما تهاجم المواد الخارجية (مثل البكتيريا والفيروسات) الجسم. وتستطيع الأجسام المضادة في الدم إبطال مفعول هذه المواد بالالتصاق بمستضداتها. والأجسام المضادة الطبيعية في الدم خليط من عدة أجسام مضادة، تتفاعل مع كثير من المستضدات؛ وبالتالي تعمل بمثابة خط دفاع أمامي للجسم ضد المرض. أما محلول المضاد الوحيد النسيلة فيعمل ضد مستضد معين، ويمكن أن يصنع بكميات كبيرة، يبشر بالنجاح في مجال البحوث الطبية.

يتم إنتاج المضاد الوحيد النسيلة في أنبوب اختبار، أو وعاء لزراعة البكتيريا، وذلك بدمج خلية ورمية مع نوع من خلايا الدم البيضاء يسمى الخلية البائية **B cell**. والنتيجة هي خلية مهجنة تسمى الهجينومة لها خصائص كل من الخلية الورمية والخلية البائية .

* تنتج الهجينومة، مثلها مثل الخلية البائية، جسمًا مضادًا معينًا.

* وتستطيع الهجينومة، مثلها مثل الخلية الورمية، النمو، وإعادة الإنتاج غير المحدّد في المختبر.

*وتنتج الهجينومة خلايا متشابهة تسمى نسائل (خلايا التّكاثر) وهي بدورها تستطيع العيش في المختبر، وتنتج كميّات كبيرة من المضادات الوحيدة النسيلة، والتي ينتج أغلبُها من خلايا حيوانات المختبر وهي الفئران عادة. وقد تم تطوير المضادات الوحيدة النسيلة البشرية أيضاً.

الاستخدامات :

يستخدم الباحثون المضادات الوحيدة النسيلة لإلصاقها بأنواع مختلفة من الخلايا للتعرف عليها،

كما تُستخدم في اختبارات تشخيصية معينة للبكتيريا والفيروسات. مثلاً تستخدم المضادات الوحيدة النسيلة في بعض اختبارات كشف الحساسية لتحديد المادة التي تسبب الحساسية،

ويأمل العلماء في استخدام المضادات الوحيدة النسيلة للكشف المبكر عن وجود السرطان .

ويمكن "مس " هذه المضادات الوحيدة النسيلة بمادة إشعاعية تساعد الأطباء على تحديد الأورام في حالة وجود خلايا خبيثة قليلة فقط.

ولذلك يمكن دمج الأدوية المضادة للسرطان مع المضادات الوحيدة النسيلة لعلاج السرطان حيث يمكنها توصيل هذه الأدوية إلى خلايا السرطان دون إتلاف الأنسجة السليمة المحيطة به.

لطخة ويسترن : (Western Blot) :

لطخة ويسترن تعرف أيضا **باللطخة المناعية (Immunoblot)** هي طريقة اكتشاف بروتين معين في عينة أو مستخلص أنسجة، وهي من التقنيات الحيوية المختبرية. تستخدم الفصل الكهربائي للهلام لفصل البروتينات الطبيعية native proteins أو البروتينات

المُتَمَسِّخة denatured proteins حسب طول السلاسل البروتينية أو حسب الشكل الثلاثي الأبعاد للبروتين. يتم في ما بعد، نقل البروتينات إلى غشاء (عادة ما يكون الغشاء مصنوعا من مادة النيتروسيليلوز أو ثنائي فلوريد متعدد الفينيليدينPVDF، حيث يتم التحقق (الاكتشاف) باستخدام أضداد مخصصة للبروتين الهدف. هناك الآن العديد من شركات المواد التي تتخصص في تجهيز أضداد (مستنسخة ومتعددة النسائل) ضد آلاف البروتينات المختلفة. وقد قام هذا بتقليل الوقت الذي تحتاجه لعمل لطخة ويسترن بصورة كبيرة.

سابقًا كان يتم تلقيح الحيوانات الكبيرة (مثل :الخرفان، العنز - يحتويان على الكثير من المصل (بالبروتين المستهدف مرتين (حيث أن الاستجابة المناعية الثانية تنتج أضدادا أكثر). ومن ثم إما يتم تصفية المصل واستخدامه (أضداد متعددة النسائل (- Polyclonal - أو يمكن فصل الخلايا البائية من الحيوان ودمجها خارج الجسم *in vitro* مع خلايا فأر سرطانية لتوليد خلايا هيبريدوما التي تستطيع في ما بعد إنتاج أضداد وحيدة النسيلة.(Monoclonal) .

تم صنع هذه الطريقة في مختبر جورج ستارك في جامعة ستانفورد عام ١٩٨١. قام وولتر نيل بورنيت بتسميتها باسم "لطخة ويسترن"، وهو مشتق من اسم اللطخة الجنوبية Southern Blot) بالإنكليزية، من Southern وهي نسبة إلى إدون ساذرن Edwin Southern، والتي تعني أيضا الجنوبي بالإنكليزية .فسميت التقنية الجديدة بـ**ويسترن**، تلاعبا بالمعنى .(واللطخة الجنوبية تقنية لاكتشاف الحمض الريبي النووي منقوص الأكسجينDNA ، قام إدون ساذرن Edwin Southern بصنعها عام ١٩٧٥. تسمى طريقة اكتشاف الحمض الريبي النووي RNA باسم اللطخة الشمالية.

الاستخدام الطبي لهذه التقنية :

١. إحدى اختبارات الكشف على فيروس نقص المناعة البشرية توظف اللطخة الغربية لاكتشاف الجسم المضاد للفيروس HIV في عينة مصل الإنسان. بروتينات من خلايا معروفة الإصابة بفيروس HIV يتم فصلها وبقعها على غشاء.

ثم يتم تجربة المصل بصورة جسم مضاد أولي

ثم يتم غسل الأجسام المضادة غير الملتصقة، ويتم وضع جسم مضاد ثانوي ضد-بشري مرتبط بإنزيم الإشارة.

الحزم المصبوغة تدل على البروتينات التي تتعرف عليها الأجسام المضادة في مصل المريض.

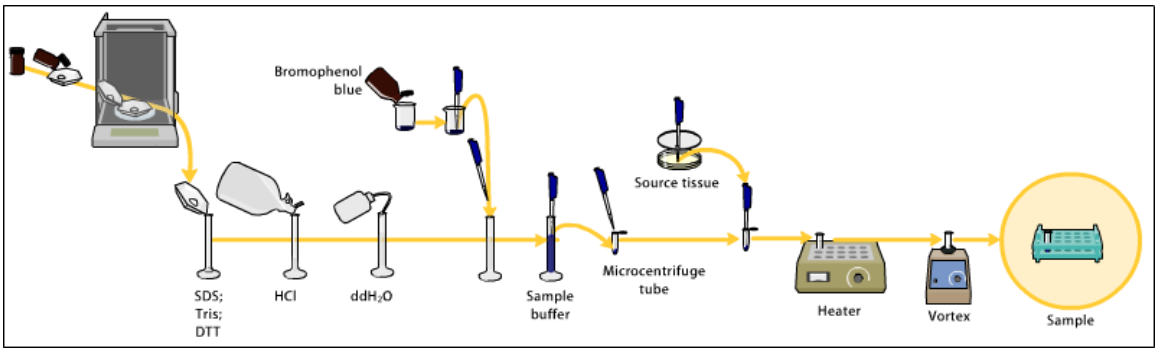
٢. يتم أيضاً استخدام اللطخة الغربية كاختيار مؤكد لمرض جنون البقر .Bovine spongiform encephalopathy (BSE).

٣. يتم استخدام اللطخة الغربية لاختبار بعض أنواع مرض لايم Lyme diseaseالذي هو التهاب بكتيري.

خطوات لطخة ويسترن :

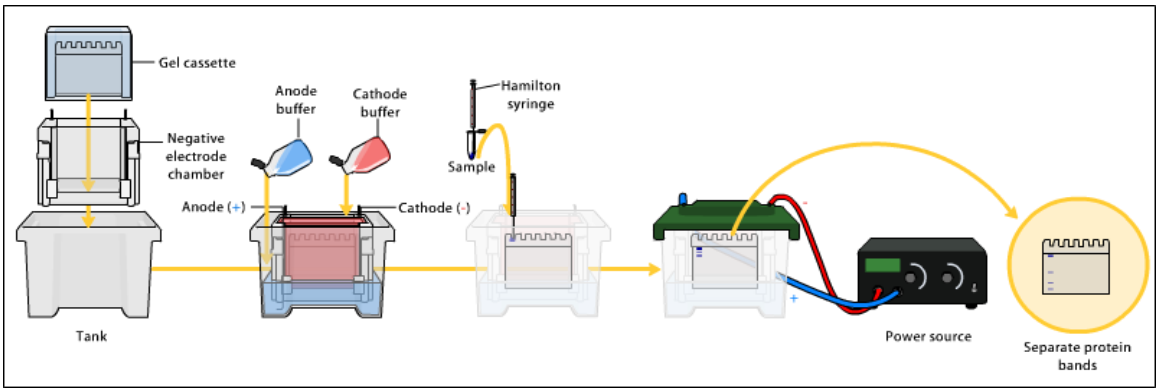
١. تحضير الأنسجة

يتضمن اخذ العينات من انسجة كاملة من زراعة الخلايا حيث يتم كسر الانسجة الصلبة ميكانيكيا" في اغلب الاحيان باستخدام خلاط لاحجام العينات الكبيرة باستخدام مجنس Homogenizer لاحجام العينات الصغيرة، او بالصوتنة Sonication يمكن كسر وفتح الخلايا باحدى الطرق المذكورة اعلاه ايضا".



٢. الفصل الكهربائي للهلام

يتم ترحيل البروتينات الموجودة في العينة أو النسيج كهربائياً بعد فصلها وإذابتها بواسطة محاليل خاصة ،حيث ترحل البروتينات حسب وزنها الجزيئي



٣. النقل

من أجل جعل الوصول للبروتينات أسهل للأكتشاف بالأجسام المضادة، يتم نقلهم من الهلام إلى غشاء مصنوع من النيتروسيليوز أو الـ PVDF polyvinylidene fluoride. يتم وضع هذا الغشاء فوق الهلام، ووضع مجموعة من طبقات أوراق الترشيح فوق ذلك. ثم يتم وضع الطبقات كلها في محلول يقوم بالتنقل إلى الأعلى عبر الأوراق بالخاصية الشعرية Capillary action ، جالباً البروتينات معه إلى الغشاء.

٤. السد او الاغلاق Blookink

كلاً من الغشائين نيتروسيليلوز أو (PVDF له خاصية الالتصاق غير المحدد بالبروتيات (أي أنهم يلتصقون بأي بروتين بصورة متساوية) ، لذا يجب اتخاذ إجراءات خاصة لمنع التفاعلات بين الغشاء والجسم المضاد المستخدم لاكتشاف البروتين المجهول (لان الأجسام المضادة هي أصلا بروتينات) يتم سد المواقع التي قد تلتصق فيها الأجسام المضاد بحيث لا تبقى أماكن في الغشاء غير مواقع البروتينات المجهوله (المراد الكشف عنها) ،وذلك باستخدام محلول مخفف من بروتين مثل ألبومين مصل البقر BSA Bovine

Serum Albuminتم وضعه فوق الغشاء وتركة على جهاز الهزاز لمدة ساعة (يختلف الوقت باختلاف الشركة المصنعة) وبهذا عندما يتم إضافة الجسم المضاد، لن يكون هناك مكان له ليلتصق غير على مواقع الالتصاق على البروتين االمجهول . هذا يقلل "التشويش" في النتيجة النهائية للطخة ويسترن، ويؤدي إلى نتائج أوضح، ويقضي على النتائج الإيجابية المزيفة التي قد تحدث في اختبار الاليزا.

٥. الاكتشاف Detection

يتم في هذه المرحلة الكشف عن وجود البروتين المطلوب على الغشاء عن طريق استخدام جسم مضاد معلم بالإنزيم بطريقة مشابهه لفحص الاليزا. حيث يتم إضافة الأجسام المضادة Abs(التي توفرها الشركة والتي تكون نوعية للبروتين الذي نرغب في إيجاده)على الغشاء ويحضن لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة او طول الليل Over night عند ٤مْ :

- نقوم بغسل الغشاء ٣ مرات لمدة ١٠- ١٥ دقيقة
- إضافة الأجسام المضادة المعلمة بالإنزيم Abs-Eثم يحضن لمدة ساعتين عند درجة حرارة الغرفة
- غسل الغشاء ٣مرات لمدة ١٠-١٥ دقيقة.
- وضع مادة الـ Substrate على الغشاء و يلاحظ بعدها ظهور الحزم Bands للبروتين المرغوب الكشف عنه في حالة وجودة.

٦. التحليل :

- 1.6.1الاكتشاف اللوني Colorimetric detection
- 1.6.2الإضاءة الكيميائية Chemiluminescence /
- 1.6.3الاكتشاف المشع Radioactive detection
- 1.6.4الاكتشاف الفلوري Fluorescent detection /

من التقنيات الاخرى المتعلقة هي استخدامالاجسام المضادة لاكتشاف البروتينات في الانسجة او الخلايا باستخدام الصبغة المناعية Immunostaining والاليزا ELISA.