



جامعة الجزيرة الخاصة
ALJAZEERA PRIVATE UNIVERSITY

Cell Culture IV

Pharmaceutical Biotechnology -Spring 2018-2019

Lecture # 5

of Students Slides: 30

Lina Albitar, *R.Ph., M.D., Ph.D.*

Faculty of Pharmacy
Aljazeera Private University

Lecture 4-Outline

• الطرق العامة

– اعادة زرع الخلايا الملتصقة

– اعادة زرع الخلايا المعلقة

– حفظ الخلايا بالتجميد (فائق التبريد)

– تذويب الخلايا المجمدة

Subculturing Adherent Cells

اعادة زرع الخلايا الملتصقة

- جميع المحاليل و الادوات التي على تماس مع الخلايا يجب أن تكون عقيمة

1. يزال وسط الزرع الحالي ويرمى

2. تغسل الخلايا بلطف باستخدام 2-5 مل وقاء ملحي متوازن

بدون مغنزيوم و لا كالسيوم

1. تزيل خطوة الغسل أي أثر للمصل و الكالسيوم

والمغنزيوم التي قد تثبط فعل أنزيم الفصل

2. يضاف محلول الغسل لجانب الوعاء لتجنب تخريب

(اقلاق) طبقة الخلايا

3. يميل الوعاء يمنا ويسرة عدة مرات

4. يزال سائل الغسل ويرمى

3. يضاف 0.5-2 مل من أنزيم الفصل (تريسين) الدافئ الى جانب الدورق:

1. يميل الوعاء بلطف ليغطي كامل سطح الخلايا
2. يحضن الوعاء في درجة حرارة الغرفة ل~2 دقيقة (قد تختلف المدة حسب الخط الخلوي المستخدم)
3. تراقب الخلايا تحت المجهر اذا فصلت، اذا كانت نسبة الخلايا التي انفصلت اقل من 90% يزداد زمن الحضان بضع دقائق مع التحريك كل 30 ثانية
4. نقر الوعاء من جانبه قد يسرع انفصال الخلايا

4. اذا كانت نسبة الخلايا المفصولة $\geq 90\%$:

– يضاف ضعف الكمية التي استخدمت من سائل الفصل من

وسط زرع كامل دافئ

– يوزع السائل بواسطة الممص على كامل سطح الخلايا

عدة مرات

5. تنقل الخلايا الى انبوب مخروطي 15 مل وتثقل لمدة 5-10

دقائق. تختلف السرعة ومدة التثقل حسب نمط الخلايا

ويرمى السائل الطافي

6. الى الرسابة يضاف مقدار من سائل وسط الزرع الخاص بنمط الخلايا المزروعة (دافئ) حسب كثافة الخلايا المرغوبة وبعد المزج الجيد بالممص يؤخذ جزء من معلق الخلايا الى وعاء زرع خلايا جديد

7. يكتب تاريخ اليوم واسم الخلايا ورقم اعادة الزرع (Passage) خارج وعاء الزرع من الاعلى ويوضع بعدها بالحاضنة

- ملاحظة: في حال استخدام دوارق للزرع تأكد أن غطاء الوعاء محلول قليلا قبل وضعهم بالحاضنة بما يضمن تبادل غازي مناسب مع الوسط

- في حال استخدمنا أغطية تمرر الغاز وبالتالي الدوارق مهواة فلا داعي لحل الاغطية

Subculturing Suspension Cells

إعادة زرع الخلايا المعلقة

- إعادة زرع الخلايا المعلقة مقارنة بإعادة الزرع للخلايا الملتصقة:

1. أقل تعقيداً

2. أسرع وأقل رضاً للخلايا

3. لا حاجة للفصل الانزيمي من سطح وعاء الزرع

- لا داعي لتبديل وسط الزرع في أوساط زرع الخلايا المعلقة
انما تغذى الخلايا باضافة وسط زرع كل 2-3 أيام الى أن
يصلوا الى مرحلة اعادة الزرع near confluence:

1. تمديد مباشر للخلايا بدورق زرع الخلايا ليستمر تكاثرهم أو

2. سحب جزء من الخلايا من دورق زرع الخلايا وتمديد باقي

الخلايا الى كثافة مناسبة لذلك الخط الخلوي

- عادة طور التباطؤ الذي يلي اعادة الزرع أقصر للخلايا

المعلقة من تلك الملاحظ للخلايا الملتصقة

Freezing Cells – Cryopreservation

حفظ الخلايا بالتجميد (فائق التبريد)

- الخط الخلوي cell line هو مصدر قيّم واستبداله (اذا تلف) غالي ومستهلك للوقت ولذا من الأهمية البالغة تجميد كمية منه بالتبريد الفائق وحفظه بالتخزين طويل الأمد للأسباب التالية:

1. الزرع المستمر يجعل الخلايا عرضة لانحرافات جينية genetic drift
2. تصاب الخطوط الفانية بالشيخوخة
3. جميع الخلايا المزروعة قابلة للاصابة بالتلوث
4. في أفضل المخابر هناك امكانية لتعطل أحد الأجهزة

- أثناء إعادة الزرع حالما يتوفر فائض صغير من الخلايا يجب تجميده وحفظه كمخزون وحمايته ولا يسمح باستخدامه بالمخبر ويدعى بالمخزون المجمد **seed stock**
- يمكن تحضير الخلايا وتجديدها من ال **seed stock** المخزون المجمد كلما احتاج الامر مع مراعاة المحافظة على بقاء رقم جيل الخلايا أدنى ما يكون وأقرب لرقم المخزون المجمد

- أفضل طريقة لحفظ الخلايا المزروعة بالتجميد هي عن طريق تخزينها بالآزوت السائل في وسط كامل بوجود عامل واقى من التبريد cryoprotective مثل دي ميتيل سولفاكسيد (DMSO) dimethylsulfoxide

• العوامل الواقية من التبريد Cryoprotective:

1. تخفيض درجة تجمد الوسط السائل

2. تسمح بسرعة rate تبريد أبطأ

3. تخفيض لحد كبير تشكل بلورات ثلج والتي تؤدي الخلايا

وتسبب موت خلوي cell death

- يتم التعامل مع DMSO بحذر لأنها مادة سامة ولذا يوصى بارتداء كفوف وحماية الوجه بنظارات أو درع أثناء العمل
- والتخلص من الكميات الفائضة من الكواشف الحاوية DMSO بالتلاؤم مع قوانين المخبر أو القوانين الناظمة المحلية

ارشادات حفظ الخلايا بالتجميد

1. تجمد الخلايا المزروعة بتركيز مرتفع و رقم **passage** منخفض قدر الامكان
2. يجب التأكد أن الخلايا هي قابلة للحياة بنسبة **90%** على الأقل قبل المباشرة بتجميدها
3. تعتمد شروط التجميد المثالية على الخط الخلوي المستخدم

4. يتم تجميد الخلايا ببطء شديد عن طريق خفض درجة الحرارة حوالي 1°C بكل دقيقة واحدة باستخدام ثلاجة مضبوطة أو وعاء خاص مثل "Mr. Frosty" وباستخدام سائل التجميد freezing medium مناسب (يجب أن يحوي عامل واقى من التبريد مثل glycerol أو DMSO)

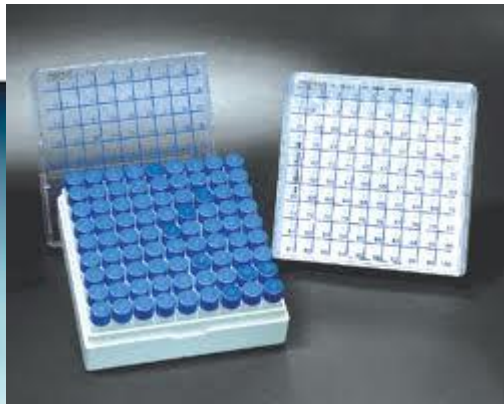


5. أثناء خفض درجة الحرارة (درجة بالدقيقة) يتم حفظ الخلايا بدرجة تحت -70°C فالخلايا تبدأ بالتدهور بدرجة أعلى من -50°C

6. نستخدم أنابيب تجميد cryovials عقيمة خاصة لحفظ الخلايا المجمدة



7. تحفظ أنابيب التجميد cryovials مغموسة في الأزوت السائل أو في الطور الغازي فوقه



8. دوماً ارتدي أدوات الحماية الشخصية



الإجراء العام لحفظ الخلايا المزرودة بالتجميد (التبريد الفائق)

1. جهز سائل التجميد واحفظه في درجة $2-8^{\circ}\text{C}$
– سائل التجميد المناسب يعتمد على الخط الخلوي
2. للخلايا الملتصقة، افصل الخلايا بشكل لطيف من وعاء
زرع الخلايا (كما في إعادة الزرع) وعلق الخلايا بسائل
الزرع المستخدم لنمط الخلايا

3. يحدد العدد الكامل من الخلايا و نسبة الخلايا القابلة للحياة (بالتعداد وتريبان بلو ...) وبناء عليه وحسب كثافة الخلايا الحية المرغوبة تحسب الكمية اللازمة من سائل التجميد

4. تتقل الخلايا (تختلف مدة وسرعة التثقيل بناءً على نمط الخلايا) ويرمى السائل الطافي.

5. يعاد تعليق رسابة الخلايا في الكمية المحسوبة من سائل التجميد البارد بناء على نمط الخلايا والكثافة المرغوبة

6. توزع الكمية الناتجة على أنابيب التجميد cryovials، مع تكرار التعليق للحفاظ على تجانس معلق الخلايا

7. تجميد الخلايا:

– في جهاز تجميد مضبوط بحيث يتم خفض درجة الحرارة
1°C بالدقيقة

– أو توضع فيالات الخلايا في أداة تجميد مثل “Mr. Frosty” الحاوي على ايزوبروبانول isopropanol ويوضع الجميع في الثلاجة **80°C–** حتى اليوم التالي

8. في اليوم التالي تنقل الخلايا المجمدة الى الأزوت السائل
وتحفظ في الطور الغازي

Thawing Frozen Cells

تذويب الخلايا المجمدة

- عملية التذويب هي عملية مجهددة للخلايا المجمدة، و يتضمن العمل بسرعة واستخدام تقنية جيدة أن تنجو نسبة كبيرة من الخلايا وتحمل عملية التذويب

إجراء عام لتذويب خلايا مجمدة

1. تذوب الخلايا المجمدة بشكل سريع (**1 minute <**) في حمام مائي بدرجة حرارة 37°C
2. الخلايا المذوبة **تمدد ببطء** باستخدام وسط سائل مدفاً لدرجة حرارة 37°C
3. تزرع الخلايا المذوبة **بكثافة مرتفعة** لضمان استرداد أعظمي منها

ملاحظات عامة لتذويب الخلايا المجمدة

- تحوي الفيالات المخزنة في الطور السائل من الأزوت السائل على خطر الانفجار عندما تذوب وبعض سوائل التجميد تحوي DMSO، مادة سامة تدخل للأنسجة وتسهل وصول الجزيئات العضوية لها لذا:

– دوما ارتدي جميع ادوات الوقاية الشخصية، بما فيها قناع وجه أو نظارات

– تعامل مع الكواشف الحاوية على DMSO بما يتناسب مع الخطر الذي تشكله

طريقة تذويب الخلايا المجمدة

1. تخرج فيالات الخلايا المجمدة من مخزن الآزوت السائل وتوضع فوراً في الحمام المائي بدرجة 37°C
2. تذوب الخلايا بسرعة بتحريك الفيال بشكل دائري بلطف في الحمام المائي ذو الدرجة 37°C الى أن يبقى بعض الثلج في الفيال (لا يذوب كاملاً)

3. يرش الفيال من الخارج باللايتانول 70% ويجفف و يدخل
لحجيرة زرع خلايا

4. تنقل الخلايا المذابة نقطة نقطة الى دورق يحوي على وسط
الزرع السائل وبعد تفحص الدورق تحت المجهر يوضع في
الحاضنة ويتم تغيير وسط الزرع في اليوم التالي (كما
بالفيديو المشاهد بالصف)

5. أو تنقل الخلايا المذابة نقطة نقطة الى أنبوب مثقلة يحوي الكمية المطلوبة من سائل الزرع الكامل ويثقل معلق الخلايا 5-10 دقائق بسرعة ضعيفة ($200 \times g$)

6. بعد التنفيل يتم التأكد من وجود رسابة الخلايا ويتم التخلص من السائل الطافي بطريقة عقيمة وبدون اطلاق الرسابة

7. يعاد تعليق الرسابة في وسط زرع كامل وينقل الى وعاء زرع مناسب ويوضع في بيئة الزرع المناسبة

8. حجم الدورق المناسب يعتمد
على تعداد الخلايا المجمدة في
الفيال وتختلف بيئة الزرع
حسب الخلايا و نمط وسط
الزرع

