

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

تاریخ دریافت مقاله: ۹۸/۷/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۲/۲۴

### چکیده

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

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

**یافته‌ها:** آزمایش‌های انجام شده بر روی لاین سلولی مذکور نشان می‌دهد که این سلول دارای ویژگی‌های رشد مناسب بوده و فاقد آلودگی‌های متقاطع می‌باشد. همچنین هویت سلول با روش‌های کاربوتایپینگ و مولکولار تایید شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج آزمایش‌های مختلف نشان می‌دهد که این لاین سلولی الزامات لازم برای استفاده در تولید و کنترل کیفیت فرآورده‌های بیولوژیک و همچنین مطالعات تحقیقاتی را دارا می‌باشد.

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

فرشته ضیائی فرا<sup>۱</sup>، سینا سلیمانی<sup>۲\*</sup>، محسن لطفی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> کارشناسی ارشد رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> دکترای تخصصی ویروس شناسی، استادیار دپارتمان بیوانک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران  
<sup>۳</sup> دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشیار دپارتمان کنترل کیفی واکسن‌های ویروسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

### نویسنده مسئول:

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

۰۹۱۲۱۷۷۸۱۰۳

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

## مقدمه

تکنولوژی کشت سلول، در طول قرن اخیر به طور گسترده‌ای افزایش یافته است بطوری که تاثیر این تکنولوژی بر جامعه بشری و پیشرفت آن بر علم بیولوژی قابل توجه بوده است.<sup>۱</sup> فرآیند کشت به پاساژ سلول‌های جدا شده از بافت اصلی، کشت اولیه یا از لاین سلولی که جداسازی آن به صورت آنزیمی، مکانیکی و یا شیمیایی صورت می‌گیرد، اطلاق می‌گردد که می‌تواند به شکل یک مونولایر روی سطح جامد یا به شکل سوسپانسیون کشت شود.<sup>۲</sup> طی این فرایند سلول‌ها تحت شرایط کنترل شده‌ای در بیرون از محیط داخلی بدن رشد می‌کنند که معمولا شامل مواد مغذی ضروری (اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی)، فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و گازها (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>) با تنظیم محیط فیزیکی (pH، فشار اسمزی، دما) می‌باشد.<sup>۳</sup> از کاربردهای آن می‌توان به ارزیابی اثربخشی و یا سمیت داروهای جدید، تولید واکسن و بیوداروها اشاره کرد.<sup>۴</sup> انواع کشت سلول از کشت‌های پرایمری، سلول‌های دیپلوئید و لاین‌های سلولی پیوسته شکل می‌گیرند.<sup>۵</sup> سلول‌های فیروبلاستی به طور گسترده در کشت‌های پرایمری ناپایدار یا در لاین‌های سلولی پایدار و ترانسفورمه به کار گرفته شده است. اخیرا فیروبلاست‌ها به عنوان منابعی جهت مدل سازی بیماری در طی برنامه ریزی‌های سلولی مناسب شناخته شده است.<sup>۶</sup> لاین سلولی فیروبلاستی BHK-21 در سال ۱۹۶۱ از کلیه پنج همستر طلائی سوری به نام مزوکریستوس آرثوتوس یک روزه جدا شد.<sup>۶</sup> این لاین سلولی از ATCC و سایر آزمایشگاه‌هایی که آن را به صورت منحصر به فرد نگهداری می‌کنند، قابل تهیه است.<sup>۶</sup> این سلول یکی از رایج‌ترین سلول‌های کاربردی جهت آماده سازی بذرها و ویروسی و تولید واکسن‌هاست.<sup>۷</sup> طی پژوهشی که توسط Perrin و همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام شد، از کشت سوسپانسیون BHK-21 برای تهیه آزمایشی واکسن هاری استفاده کردند.<sup>۸</sup> همچنین Birrl و همکاران در سال ۱۹۹۲، موفق به تولید فاکتور رشد فیروبلاست بنیادی با استفاده از دستکاری این لاین سلولی به وسیله پلاسمید pSV2/neo شدند.<sup>۹</sup> هدف از انجام این مطالعه بررسی متناسب بودن لاین سلولی BHK موجود در ایران جهت تولید و کنترل کیفیت واکسن و مطالعات تحقیقاتی - تشخیصی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### کلون کردن سلول‌ها

پس از تهیه کرایوتیوپ حاوی سلول BHK-21 C5 M007 از بانک سلول موسسه رازی، کلونینگ سلول به روش Limit dilution روی میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد و کلون‌های برتر از چاهک‌هایی که دارای یک سلول واحد بودند با بررسی روزانه و متوالی کیفیت و سرعت رشد و تکثیر، انتخاب و در میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای با محیط DMEM و ۱۰ درصد سرم کشت شدند.<sup>۲</sup> پس از انتقال کلون‌های سلولی منتخب از میکروپلیت به فلاسک، طی سه پاساژ متوالی ضمن حفظ و تکثیر سلول، در نهایت ۴ کلون سلولی به عنوان برترین کلون‌ها از لحاظ پایداری و ماندگاری سلول‌ها ذخیره سازی شد.

### پاساژ Master cell جهت دستیابی به Working cell

#### کرایوپرزرویشن

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

#### بررسی ویژگی‌های رشد سلول

کرایو ویال اول از بذر سلول مادر و کاری در فلاسک سلول کشت گردید و خصوصیات رشد سلول از جمله درصد بقا، موفولوژی سلول، زمان دو برابر شدگی سلول و ضریب  $\mu$ ، هموزنیستی و منحنی رشد سلول‌های BHK بر اساس نتایج روزانه شمارش سلول تعیین شد.<sup>۲</sup>

#### آزمایش سترونی

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

### تعیین هویت سلول با تکثیر ژن اختصاصی گونه توسط

#### PCR

سوسپانسیون غلیظی از هر یک از لاین های سلولی BHK در کنار لاین های سلولی CHO (Chinese hamster ovary)، Vero (Monkey Green Kidney) RBK (Razi Bovine Kidney)، سلول دیپلوئید MRC5، پرایمری LK (Lamb kidney) و سلول پرایمری GL (Goat Lymphocyte) تهیه و ۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از سه بار شستشو با محلول PBS به منظور استخراج DNA از کیت استخراج و تخلیص DNA (شرکت تکاپو زیست) استفاده گردید و تکثیر قطعه ای از ژن زیر واحد ۱ سیتوکروم C اکسیداز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه دریافتی از شرکت تکاپو زیست انجام شد.<sup>۱۲</sup> برای انجام PCR از کیت شرکت سیناژن استفاده شد. از سلول CHO با منشا هامستر به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. تکثیر ژن COI در دستگاه ترموسایکلر طبق دستورالعمل کیت، با ۵ دقیقه دناتوراسیون در ۹۵ °C و سپس طی ۳۰ تا ۳۵ سیکل شامل سه مرحله دناتوراسیون شدن (Denaturation)، اتصال پرایمرها (Annealing) و گسترش یا طولی سازی (Extension or Elongation) انجام شد. در نهایت برای مدت ۱۰ دقیقه عمل گسترش در ۷۲ °C ادامه یافت تا عمل پلیمریزاسیون تکمیل گردد، سپس الکتروفورز انجام شد.<sup>۱۳</sup>

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

۱۴ روز انکوبه شد. ب) مایکوپلاسمایی: با تزریق یک میلی لیتر عصاره سلولی با چرخه ذوب و انجماد به ۱۰ ml محیط کشت pplo broth و حدود ۰/۲ml روی محیط pplo agar کشت شده و به مدت ۲۱ روز در شرایط هوایی و بی-هوایی انکوبه شد. ج) مایکوباکتریومی: ۰/۵ml عصاره سوسپانسیون غلیظ سه مرحله فریز تا و شده به دو لوله محیط لون اشتاین تلقیح شد و مدت ۴۵ روز به صورت خوابیده در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفتند.<sup>۱۱</sup>

### کاربوتایپ

جهت توقف سلول ها در مرحله متافاز کلشی سین با غلظت ۰/۰۴ درصد میلی گرم/ میلی لیتر افزوده و ۴ تا ۵ ساعت انکوبه شد. مونولایر سلولی پس از شستشو با PBS، تریپسینه شد و اثر آن با افزودن سرم خنثی سازی شد. سوسپانسیون سلولی با افزودن PBS و پیپتینگ سلول ها و ۵ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ rpm رسوب داده شد. در مرحله بعد با افزودن محلول ۰/۰۷۵ kcl مولا، ۲۰ دقیقه درون بن ماری انکوبه و پس از سانتریفوژ و خروج kcl رسوب ایجاد شده به حالت سوسپانسیون در آمد و با افزودن فیکساتیو سرد، ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت. افزودن فیکساتیو ۳ مرحله دیگر تکرار و سانتریفوژ انجام شد. در نهایت ۲ تا ۳ قطره از سوسپانسیون سلولی از فاصله ۲۰ سانتی متری و با زاویه ۴۵ درجه بر روی لام سرد چکانیده شد و با رنگ آمیزی به وسیله رنگ گیمسا تعداد کروموزوم های سلول در هر میدان شمارش گردید.<sup>۱۱</sup>

جدول ۱: ردیف پرایمرهای گونه اختصاصی<sup>۱۲</sup>

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

جدول ۲: ردیف پرایمرهای گونه های دیگر<sup>۱۳</sup>

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

### بررسی آلودگی بذر سلول مادر به ویروس‌های ناخواسته

#### بررسی وجود ویروس‌های ناخواسته در بذر سلول از طریق کشت

این آزمایش به دو صورت مستقیم از طریق ایجاد ضایعات ویروس روی سلول (CPE) در طول دوره انکوباسیون کشت سلول یا به صورت غیرمستقیم با جذب گلبول‌های قرمز خوکچه هندی و یا جوجه توسط بستر سلولی، امکان آلودگی ویروسی سلول مورد مطالعه را مشخص می‌نماید.<sup>۱۴</sup> برای انجام این آزمایش ۵ ml سوسپانسیون غلیظ حاوی  $10^7 \times 1/4$  سلول در یک لوله تهیه شد. در فریزر  $70^\circ\text{C}$  قرار داده شد و سه مرتبه فریز تا وگرددید. پس از آن ۲۰ دقیقه با  $800\text{g}$  (حدود  $2800\text{ rpm}$ ) سانتریفیوژ گردید و مایع رویی برداشت شده و تا قبل از تلقیح به فلاسک‌های کشت سلول نشانگر در فریزر ذخیره شد. سپس سه لاین سلول RBK, CHO, Vero به عنوان سلول‌های نشانگر انتخاب و کشت داده شدند. برای هر کدام از لاین‌های سلولی سه فلاسک با عنوان نمونه مورد آزمایش، کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته و به هریک از فلاسک‌های آزمایش یک میلی‌لیتر از عصاره سلولی BHK افزوده و به مدت ۱ ساعت به منظور جذب انکوبه شد. نمونه‌های کنترل مثبت لاین‌های سلولی RBK, CHO, Vero به ترتیب به ویروس‌های سائیتوپاتیک سرخک، ویروس غیرسائیتوپاتیک اوربیون و پارائفلونزای تیپ ۳ گاوی (PI3) (Bovine Parainfluenza-3 Virus) آلوده شدند. محیط DMEM با ۲٪ سرم تهیه شده (محیط نگهدارنده) به تمام فلاسک‌ها افزوده و در دمای  $37^\circ\text{C}$  با  $5\% \text{CO}_2$  به مدت ۱۴ روز انکوبه شد. برای انجام آزمایش Haemadsorption شش فلاسک کشت از سه لاین سلول RBK, CHO, Vero حاوی عصاره سلولی BHK همراه سه فلاسک کنترل منفی ۱۴ روز انکوبه شدند. به سه فلاسک از هر سلول ۴ ml از محلول ۰/۵٪ گلبول قرمز جوجه و به سه فلاسک دیگر هم به همین میزان گلبول قرمز خوکچه هندی اضافه شد. به فلاسک کنترل منفی هر سه سلول ۴ ml از مخلوط گلبول قرمز خوکچه و جوجه افزوده و از محلول ۰/۵٪ گلبول قرمز خوکچه ۴ ml به فلاسک کنترل مثبت (سلول Vero آلوده به ویروس اوربیون) اضافه شد. کلیه فلاسک‌ها ۳۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۴ و ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه و

پس از شستشو سطح سلول‌ها با PBS، مورد پایش قرار گرفتند.

#### بررسی وجود ویروس‌های ناخواسته در بذر سلول با تزریق به تخم مرغ جنین دار

۰/۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل از سانتریفیوژ عصاره سلولی فریز تا و شده به مایع النتوئیک ۱۰ تخم مرغ جنین دار SPF ۱۰ روزه تزریق گردید و ۵ تخم مرغ جنین دار به عنوان شاهد در نظر گرفته و ۶ روز پس از انکوباسیون در دمای  $37^\circ\text{C}$  در یخچال قرار گرفتند. آزمایش هم‌آگلوتیناسیون تسریع شده (Rapid Haemagglutination) با افزودن ۵۰ میکرولیتر از مایع النتوئیک تخم مرغ‌ها داخل هر گوده میکروپلیت و ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز خوکچه انجام شد. گلبول قرمز خوکچه و نمونه ویروس نیوکاسل به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. مشابه همین روش با مایع النتوئیک تخم مرغ‌های آزمایش و شاهد با گلبول قرمز جوجه انجام شد.<sup>۱۵</sup>

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

۵ میلی‌لیتر عصاره سلول لیز شده BHK به ۱۰ سر موش بالغ مورد آزمایش هر کدام ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت داخل صفاقی تزریق شد و ۶ سر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به ۱۰ سر موش شیر خوار یک روزه هر کدام مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر به صورت صفاقی تزریق و با ۱۰ سر موش شاهد به مدت ۴ هفته مورد بررسی قرار گرفتند.<sup>۱۶</sup>

#### آزمایش تومورزایی (Tumorigenicity)

به ۱۰ موش nude نوزاد،  $10^7$  سلول BHK یا سلول‌های توموری کنترل مثبت یعنی سلول Hela (دارای خاصیت تومورزایی پیشرونده)، هر موش ۰/۱ میلی‌لیتر با سرم فاقد محیط کشت به صورت زیر جلدی تلقیح شد. موش‌ها در فواصل منظم و متوالی به مدت سه هفته از نظر شکل گیری ندول‌ها در محل تزریق مورد بازرسی قرار گرفتند. در هر موش پس از مرگ یا کشته شدن و یا در انتهای دوره بازرسی یک نکروپسی انجام گرفت. این نکروپسی شامل آزمایشی مبنی بر شکل گیری تومور در محل تزریق و در همه

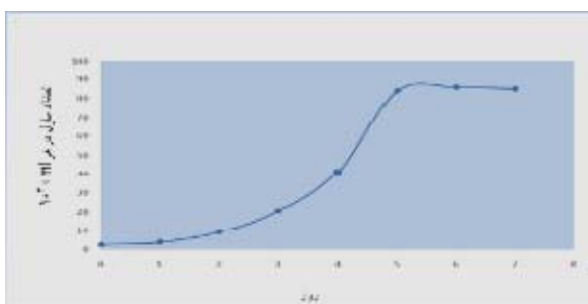
فواصل منظم صورت گرفت که به ترتیب برابر با ۲۰/۵ ساعت و ۰/۳ به دست آمد. (د) منحنی رشد سلول: شمارش روزانه تعداد سلولها طی ۷ روز انجام شد و منحنی رشد سلولها طبق نتایج به دست آمده ترسیم شد (نمودار ۱).

### آزمایش سترونی

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

### کاریوتایپ

به منظور تعیین مورفولوژی و تنوع کروموزومی، لاین سلولی کاریوتایپ گردید که نتایج به شرح زیر است (شکل ۳ و ۲، نمودار ۲).



نمودار ۱: منحنی رشد سلول BHK

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

### ملاحظات اخلاقی

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

### یافته‌ها

#### تعیین خصوصیات رشد سلول: الف) مورفولوژی سلول

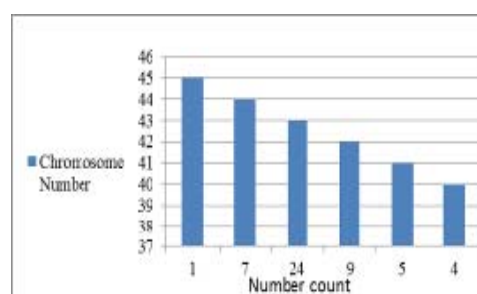
در طول این مطالعه کشت سلول BHK، به صورت یک منولایر سلولی یک نواخت (شکل ۱) تشکیل شد. (ب) درصد بقای سلول: تعداد سلولهای زنده‌ی شمارش شده در لام نوبار برابر با ۹۴،۱۰۷،۱۰۵،۹۷ و تعداد سلولهای مرده برابر با ۵۸،۶،۷ بود و درصد بقا ۹۲٪ محاسبه شد. (ج) زمان دو برابر شدن سلول و ضریب  $\mu$ : با رسیدن سلولها به فاز لگاریتمی رشد، شمارش سلولها در



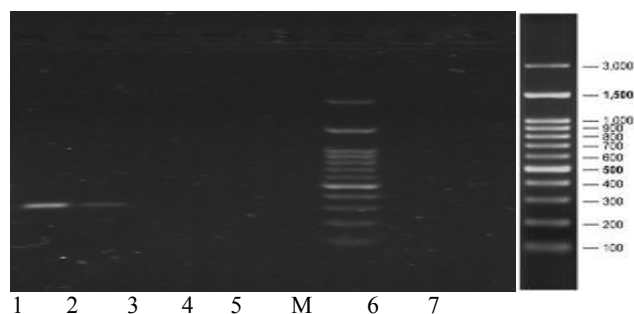
شکل ۱: کشت سلول BHK با بزرگنمایی X ۱۰۰



شکل ۲: یک نمونه از کاریوتایپ سلول BHK با ۴۳ کروموزوم



نمودار ۲: نمودار تنوع کروموزوم در بذر سلول BHK



شکل ۳: الکتروفورز محصولات PCR برای تکثیر ژن سیتوکروم اکسیداز یک (CO1) میتوکندریایی سلول BHK

ستون ۱: سلول BHK با پرایمر هامستر 315bp، ستون ۲: سلول CHO با پرایمر هامستر، ستون ۳: سلول BHK با پرایمر گوسفند، ستون ۴: سلول BHK با پرایمر بز، ستون ۵: سلول BHK با پرایمر میمون، ستون ۶: سلول BHK با پرایمر انسان، ستون ۷: سلول BHK با پرایمر گاو.

### بررسی هویت سلول با تکثیر ژن اختصاصی گونه توسط

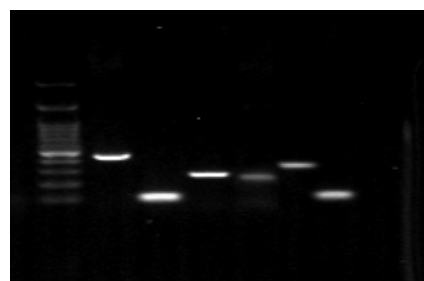
#### PCR

الکتروفورز محصولات PCR (شکل ۳) نشان می‌دهد DNA استخراج شده از سلول BHK تنها با پرایمر طراحی شده گونه هامستر تکثیر شد که در مقایسه با مارکر، طول قطعه تکثیر یافته در حدود ۳۱۵ جفت باز تعیین شد (ستون ۱). همچنین، از DNA استخراج شده سلول BHK در کنار پرایمر پنج گونه سلولی دیگر در چاهک‌های مشخص شده هیچ گونه بانندی مشاهده نشد (ستون ۳ تا ۷ شکل ۳). علاوه بر این، الکتروفورز محصولات PCR سلول‌های مختلف (شاهد مثبت) مطابق شکل ۴ نشان داده شد. DNA استخراج شده هر یک از سلول‌ها با پرایمرهای اختصاصی خود، باند با سایز قابل انتظار نشان داده است (ستون ۱ تا ۶).



شکل ۴: کروموزوم‌های دسته بندی شده در یک سلول ۴۴

کروموزومی BHK-21C5



شکل ۴: الکتروفورز محصولات PCR برای تکثیر ژن سیتوکروم

اکسیداز یک (CO1) سلول‌های مختلف (شاهد مثبت)

ستون ۱: سلول شاهد PAE با پرایمر خوک 460bp، ستون ۲: سلول RBK با پرایمر گاو 102bp، ستون ۳: سلول LK با پرایمر گوسفند 267bp، ستون ۴: سلول Vero با پرایمر میمون 222bp، ستون ۵: سلول MRC5 با پرایمر انسان 391bp، ستون ۶: سلول لئفوسیت بز با پرایمر بز 117bp

### بررسی آلودگی بذر سلول مادر به ویروس‌های ناخواسته

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

### آزمایش تومورزایی

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

## بحث

امروزه واکسن‌هایی بر پایه کشت سلول از لاین‌های سلولی پستانداران توسعه پیدا کرده‌اند. پتانسیل استفاده از کشت سلول در توسعه واکسن‌های ویروسی در سال‌های اخیر می‌تواند به عنوان یک برنامه مکمل و جایگزین استفاده از سایر استراتژی‌ها به کار گرفته شود. از مزیت‌های اصلی استفاده از لاین‌های سلولی می‌توان به تولید سریع واکسن در طی بیماری‌های همه گیر و امکان فرآوری واکسن‌های ویروسی متعدد در شرایط و امکانات مشابه و در محیطی استریل اشاره کرد. سلول BHK از سلول‌های بسیار مناسب برای رشد و تکثیر بسیاری از ویروس‌های بیماری‌زای انسانی و دامی در دنیا مطرح می‌باشد.<sup>۲۰-۱۷</sup> اما نکته ای که استفاده گسترده از این سلول را در ایران محدود می‌کند، عدم بررسی مناسب این سلول می‌باشد. اما در دنیا مطالعات مختلفی بر روی این سلول انجام شده است. Pindak و همکاران در سال ۱۹۶۹، روی تکثیر MM ویروس در لاین‌های سلولی پیوسته مطالعاتی انجام دادند که BHK-21 از لاین‌های مناسب برای جداسازی آلودگی ویروس MM از بافت مغز موش آلوده بود و سازگاری ویروس با انجام پاساژهای سریالی که با افزایش ضایعات سلولی و افزایش تیتراژ ویروس مشخص شد.<sup>۲۱</sup> Langelier و همکاران در سال ۱۹۸۱، روی خصوصیات ریونوکلئاز ردوکتاز القایی در لاین سلولی BHK-21 (C-13) با ویروس HSV پژوهشی انجام دادند که نتایج تغییر در بیان ویروس را نشان داد.<sup>۲۲</sup> J. Rudd و همکاران در سال ۱۹۸۷، حساسیت لاین سلولی BHK-21 و لاین سلولی نوروبلاستوما مورین در جداسازی یک گونه خیابانی ویروس هاری را مورد مقایسه قرار دادند که نتایج نشان از حساسیت بیشتر لاین سلولی نوروبلاستوما مورین داشت.<sup>۲۳</sup> Linz و همکاران در سال ۱۹۹۷ بر روی استوکومیتری، سینتیک و تنظیم متابولیسم گلوکز و آمینواسید لاین سلولی BHK نوترکیب مطالعه‌ای انجام دادند که تفاوت قابل توجهی در حساسیت مواد مغذی، استوکومیتری و متابولیسم آمینواسیدها در سطوح پایین مواد مغذی مشاهده شد.<sup>۲۴</sup> Sreck و همکاران در سال ۲۰۰۸، از فاکتور رشد پروسین برای آزمایش خصوصیات رشد تکثیری بر روی لاین سلولی BHK (C-13) در شرایط آزمایشگاهی استفاده کردند که سبب تسریع تکثیر و کاهش

نیاز به سرم و دوره کشت لاین سلولی شد.<sup>۲۵</sup> در سال ۲۰۰۸، Sekar و همکاران مقایسه‌ای بر روی ویروس BTV انجام داده‌اند. شواهد به دست آمده براساس تیتراژ ویروس نشان از سازگاری گسترده ویروس با لاین سلولی BHK-21 و استقرار آن به عنوان یک لاین سلول هدف جهت تولید واکسن BTV داشت.<sup>۲۶</sup> Fernandez و Nuñez همکاران در سال ۲۰۱۵، روی بیان گلیکوپروتئین‌های ویروس هاری بر روی سوسپانسیون کشت شده از سلول BHK-21 کار کردند و مشخص شد که کاهش دما بعد از آلودگی سلولی برای بیان گلیکوپروتئین‌ها مفید خواهد بود.<sup>۲۷</sup> Singh و همکاران در سال ۲۰۱۵ به استانداردسازی آزمون خنثی‌سازی سرم از ویروس آنسفالت ژاپنی بر روی BHK-21 (C-13) پرداختند که غلظت سلولی  $1/5 \times 10^4$  جهت تشکیل مونولایر BHK در نظر گرفته شد. همچنین آزمایش خنثی‌سازی سرم (SNT) با استفاده از این لاین سلولی، به عنوان یک آزمایش جایگزین تست توانمندی واکسن معرفی شد.<sup>۲۸</sup> Mohammad Showkat Mahmud و همکاران در سال ۲۰۱۷، سازگاری سروتایپ‌های (O,A,Asia) ویروس تب برفکی روی لاین سلولی BHK-21 را مورد مطالعه قرار دادند. ضایعات سلولی ویروس روی این لاین سلولی، با گرد شدن و صاف شدن سلول‌ها، تشکیل سلول‌های غول پیکر چند هسته‌ای، شکست پل‌های بین سلولی و در نهایت مرگ سلول نشان داده شد.<sup>۲۷</sup> در سال ۲۰۱۸، ZOU و همکاران روی ترکیب mRNA سلول میزبان با ژنوم ویروس تب برفکی در کشت سوسپانسیون کار کردند. در این مطالعه ویروس تب برفکی سروتایپ 1-Asia به صورت سریالی روی مونولایر سلول BHK و بعد روی سوسپانسیون بدون سرم BHK برای تولید بذر ویروس جهت تولید واکسن‌های غیرفعال سازگاری یافت. منحنی رشد ویروس در مقایسه با گونه مادری سریع‌تر به میزان ماکزیم رسید.<sup>۲۹</sup> Nikolay و همکاران در سال ۲۰۱۸، بر روی تکثیر گونه‌های ویروس زیکا برزلی بر روی کشت سوسپانسیون و مونولایر سلول‌های BHK مطالعه کردند، کشت در بیوراکتورها با غلظت سلولی  $10^7 \times 1/2$  cells/mL و با تیتراژ ویروسی PFU/mL  $10^7 \times 3/9$  انجام شد. نتایج نشان از افزایش تعداد کل ذرات ویروسی و بازده سلولی ( $3/3$  PFU/cell) کمتر از حد تعیین شده نسبت به سلول‌های چسبنده داشت.<sup>۳۰</sup> با توجه به مطالعات مذکور و اهمیت سلول BHK-21 در تولید و کنترل کیفیت فرآورده‌های بیولوژیک و

به دست آمد امکان استفاده گسترده از این لاین سلولی به عنوان یک بستر مناسب برای تولید و کنترل کیفیت فرآورده‌های بیولوژیک و در مطالعات تحقیقاتی و تشخیصی انواع بیماری‌ها وجود دارد.

### نتیجه‌گیری

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

### تشکر و سپاسگزاری

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

### References

1. Mc Keehan WL, Barnes D, Reid L, Stanbridge E, Murakami H, Sato GH. Frontiers in mammalian cells culture. *In vitro cellular & developmental biology* 1990;26(1):9-23.
2. Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications: John Wiley & Sons; 2015.
3. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Walter P, Raff M, Roberts K. Molecular Biology of the Cell 4th Edition:

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

سپس با استفاده از PCR امکان آلودگی به برخی ویروس‌های خاص همچون BVD و BLV مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نتایجی که از آزمایشات مذکور مبنی بر مناسب بودن لاین سلولی BHK-21

International Student Edition. Routledge; 2002.

4. Brunner D, Frank J, Appl H, Schöffl H, Pfaller W, Gstraunthaler G. The serum-free media interactive online database. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation*. 2010;27(1):53-62.
5. Fernandes IR, Russo FB, Pignatari GC, Evangelinellis M, Tavolari S, Muotri AR, et al. Fibroblast sources: Where can we get them? *Cytotechnology* 2016;68(2):223-8.
6. Hernandez R, Brown DT. Growth and maintenance of



- baby hamster kidney (BHK) cells. *Current protocols in microbiology* 2010;17(1):A. 4H. 1-A. 4H. 7.
7. Mahmud MS, Islam E, Samad MA, Karim MR, Saha AK, Giasuddin M. Adaptation of Three Different BLRI Strain (O, A, Asia 1) of Foot and Mouth Disease Virus Serotypes in Baby Hamster Kidney-21 Cell Line. *Immunology and Infectious Diseases* 2017;5(2):11-5.
  8. Perrin P, Madhusudana S, Gontier-Jallet C, Petres S, Tordo N, Merten O-W. An experimental rabies vaccine produced with a new BHK-21 suspension cell culture process: use of serum-free medium and perfusion-reactor system. *Vaccine* 1995;13(13):1244-50.
  9. Brill G, Vaisman N, Neufeld G, Kalcheim C. BHK-21-derived cell lines that produce basic fibroblast growth factor, but not parental BHK-21 cells, initiate neuronal differentiation of neural crest progenitors. *Development* 1992;115(4):1059-69.
  10. Susan S, Ya S, Mm E-H. Preparation and Evaluation of Master Seed for infectious bronchitis vaccine from local variant isolate. *Nat Sci.* 2011;9:145-50.
  11. Worton RG, Duff C. [27] Karyotyping. *Methods in enzymology.* 58: Elsevier; 1979. p. 322-44.
  12. Cooper JK, Sykes G, King S, Cottrill K, Ivanova NV, Hanner R, et al. Species identification in cell culture: a two-pronged molecular approach. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2007;43(10):344-51.
  13. Schochetman G, Ou C-Y, Jones WK. Polymerase chain reaction. *The Journal of infectious diseases* 1988;158(6):1154-7.
  14. Specter SC, Hodinka RL, Wiedbrauk DL, Young SA. *Clinical virology manual: American Society for Microbiology Press*; 2009.
  15. Organization WH. Expert committee on biological standardization. Geneva, 19 to 23 October 2009. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs) 2009.
  16. Kuzmin IV. Virus Isolation in Animals: The Mouse Inoculation Test. *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, Volume 2: Elsevier*; 2015. p. 13-23.
  17. A.-C. Bachoud-Lévi ND, J.-P. Nguyen, J. Bloch, C. Bourdet, L. Winkel, P. Rémy, M. Goddard, J.-P. Lefaucheur, P. Brugières, S. Baudic, P. Cesaro, M. Peschanski, and P. Aebischer. Neuroprotective Gene Therapy for Huntington's Disease Using a Polymer Encapsulated BHK Cell Line Engineered to Secrete Human CNTF. *Human Gene Therapy* 2004;11(12):12-8.
  18. Deckwer MLAPZRWWD. Stoichiometry, Kinetics, and Regulation of Glucose and Amino Acid Metabolism of a Recombinant BHK Cell Line in Batch and Continuous Cultures. *Biotechnology Progress* 1997;13(4):453-63.
  19. Hu KCJAYNVNMJKPJCTGGKWS. Exploring the transcriptome space of a recombinant BHK cell line through next generation sequencing. *Biotechnology and Bioengineering* 2014;111(4):770-81.
  20. Buttin YLaG. Characterization of Ribonucleotide Reductase Induction in BHK-21/C13 Syrian Hamster Cell Line Upon Infection by Herpes Simplex Virus (HSV). *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY* 1981;57(1):21-31.
  21. Pindak FF, Schmidt JP. Propagation of MM virus in continuous cell lines. *Appl Environ Microbiol.* 1969;17(6):815-8.
  22. Langelier Y, Buttin G. Characterization of ribonucleotide reductase induction in BHK-21/C13 Syrian hamster cell line upon infection by herpes simplex virus (HSV). *Journal of general virology* 1981;57(1):21-31.
  23. Rudd RJ, Trimarchi CV. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *Journal of clinical microbiology* 1987;25(8):1456-8.
  24. Linz M, Zeng AP, Wagner R, Deckwer WD. Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. *Biotechnology progress* 1997;13(4):453-63.
  25. Srček VG, Radošević K, Kniewald H, Slivac I, Kmetič I, Kniewald Z. Effect of porcine brain growth factor on primary cell cultures and BHK-21 [C-13] cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2009;45(1-2):28.
  26. Sekar P, Ponmurugan K, Gurusubramanian G. Comparative Susceptibility of BHK 21 and Vero Cell Lines to Bluetongue Virus (BTV) Isolate Pathogenic for Sheep. *Internet J Microbiol.* 2009;7(1):1-5.
  27. Fernández-Núñez EG, De Rezende AG, Puglia ALP, Leme J, Boldorini VLL, Caricati CP, et al. Transient expression of rabies virus G-glycoprotein using BHK-21 cells cultured in suspension. *Biotechnology letters* 2015;37(6):1153-63.
  28. Singh S, Sharma M, Kumar S, Goyal D. Standardization of serum neutralization assay of Japanese encephalitis virus (Nakayama NIH strain) on BHK-21 (CI-13) cell line. *Acta virologica* 2015;59(3):234-9.
  29. Zou X, Zhu Y, Bao H, Guo X, Sun P, Liu Z, et al. Recombination of host cell mRNA with the Asia 1 foot-and-mouth disease virus genome in cell suspension culture. *Archives of virology* 2018;1-10.
  30. Nikolay A, Castilho LR, Reichl U, Genzel Y. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine* 2018;36(22):3140-5.

Fereshteh Ziaifar<sup>1</sup>, Sina Soleimani<sup>2\*</sup>, Mohsen Lotfi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Bio bank, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

<sup>3</sup> Department of Viral Vaccine Quality Control, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), P.O. Karaj, Iran

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

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

### Abstract

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

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

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

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

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

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

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