مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و چهارم- پائیز۱۳۹۵

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی اثرات سرم جنین گاوی بر مورفولوژی، زیستایی سلول ها و میزان تولید هورمون رشد انسانی نوترکیب در مقایسه با محیط فاقد سرم در سلول های CHO

زهرا سادات عقیلی [۱]،سید حمید زرکش اصفهانی [۱*]

۱- گروه زیست فناوری، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: برای تولید پروتئین نوترکیب به خصوص در زمینه درمانی در سلول های یوکاریوت، استفاده از محیط فاقد سرم به جای محیط کشت حاوی سرم جنین گاوی (FBS) ترجیح داده می شود.

مواد و روش ها: سلول های CHO تولید کننده پروتئین نو ترکیب به داخل محیط کشت سلولی با غلظت های مختلفی از FBS و محیط فاقد سرم اضافه شدند سپس مورفولوژی، زیستایی و تولید پروتئین نوترکیب سلول های CHO بررسی گردید.

یافته ها: سلول های CHO مورفولوژی متفاوتی در محیط کشت فاقد سرم نشان می دهند اما این سلول ها در تولید پروتئین و زیستایی سلول ها تفاوت قابل توجهی نشان نمی دهند.

نتیجه گیری: از محیط فاقد سرم برای تولید پروتئین نوترکیب توسط سلول های CHOبه طور موفقیت آمیزی می توان استفاده نمود و جایگزین مناسبی برای محیط کشت حاوی سرم هستند.

کلمات کلیدی: سلول های CHO، محیط فاقد سرم، سرم جنین گاوی، الایزا، فلوسیتومتر

مقدمه

با وجود فراوانی رده های سلولی در دسترس، امروزه حدود ۷۰% پروتئین های درمانی نوترکیب توسط سلول های تخمدان همستر چینی (CHO) ساخته می شوند. ویژگی هایی از جمله توانایی کشت این سلول ها به حالت سوسپانسیون در تراکم بالا به جای حالت چسبیده، قابلیت اصلاحات ژنتیکی به گونه ای که اجازه ورود و بیان DNA خارجی را داده و به میزان زیادی پروتئین خارجی را بیان کند، قابلیت تولید پروتئین به صورت گلیکوزیله و انجام اصلاحات پس از ترجمه مناسب برای فعالیت زیستی پروتئین، ایمن بودن سلول ها به گونه ای که هیچ ماده سمی اضافه ای به پروتئین تولید شده اضافه نمی کند، سلول های CHO را به یک رده سلولی مناسب برای تولید پروتئین های نوترکیب انسانی به ویژه با کاربردهای بالینی تبدیل کرده است. سلول های تخمدان همستر چینی (CHO) در زمان کوتاهی خود را با شرایط محیط کشت سازگار می کنند و دارای زمان نسل و نیمه عمر کوتاهی هستند. از طرف دیگر در یک مطالعه در سال ۱۹۸۹، مشخص شد که ۴۴ ویروس بیماری زای انسان از جمله آنفلونزا، HIV، پولیو، هرپس و سرخک قابلیت همانند سازی در این رده سلولی را ندارند. قابل ذکر است که آزمایش های ایمنی سازمان بهداشت جهانی پروتئین های درمانی تولید شده توسط این رده سلولی را بدون هیچ مشکلی تایید می کند (۸،۲). افزایش محصول پروتئینی و کاهش هزینه های تولید هدف اصلی در زمینه بیوتکنولوژی تولید پروتئین نوترکیب می باشد (۱۸). برای رشد سلول ها در محیط آزمایشگاهی، شرایط کشت باید از شرایط درون بدن موجود زنده تقلید کند. اکثر محیط های پایه کشت سلولی نمی توانند به تنهایی رشد سلول ها را حمایت کنند و بنابراین محیط های پایه با سرم های حیوانی غنی می شوند. عمل کرد اصلی محیط کشت سلولی برای نگهداری pH، اسمولالیته، درصد زنده بودن سلول ها ، مواد غذایی و انرژی لازم برای رشد و تکثیر سلول ها ضروری هستند. در میان مواد مورد نیاز سلول ها برای بهبود شرایط رشد سلول ها، سرم اهمیت خاصی دارد. اما امروزه تلاش می شود محیط های فاقد سرم (SFM) جایگزین محیط های حاوی سرم شود. محیط های فاقد سرم نسبت به محیط های دارای سرم مزایای زیادی هستند (۴). اضافه کردن سرم به محیط کشت سلولی برای نگهداری، تکثیر و تمایز سلول های انسانی و حیوانی در شرایط

نویسنده مسئول :
گروه زیست فناوری، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
پست الکترونیکی: s.h.zarkesh@sheffield.ac.uk
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۰۵

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]

آزمایشگاهی ضروری است. سرم حیوانی سرشار از فاکتورهای رشد، هورمون ها، پروتئین های حامل، عناصر ضروری و مواد ناشناخته دیگری است که در حضور آن سلول ها قدرت حیات و تکثیر بسیار بیشتری پیدا می کنند. در شرایطی که سرم حیوانی در محیط نگهداری سلول حضور نداشته باشد میزان زیستایی به طور چشم گیری کاهش می یابد. رایج ترین سرمی که در محیط کشت سلولی استفاده می شود سرم جنین گاوی یا FBS است، زیرا غنیتر بوده و فاکتورهای رشد بیش تری نسبت به سایر سرم ها دارد و حاوی گاماگلوبولین کمی است (۵، ۱۴، ۱۶). از جمله مشکلاتی که حذف سرم از محیط کشت به وجود می آورد می توان این موارد را نام برد: همان طور که گفته شد سرم حاوی انواع مختلفی از فاکتورهای ضروری و مفید شامل املاح، ویتامین ها و هورمون ها است که همگی برای رشد سلول ضروری هستند. حاوی انواعی از خنثی کننده های پروتئاز است که به ویژه در هنگام تریپسینه کردن سلول ها مؤثر است، سلول ها را در برابر نیروهای برشی اعمال شده توسط همزن در کشت سوسپانسیون به طور غیراختصاصی تاحدی محافظت می کند، توانایی اتصال به برخی مواد سمی را داشته موجب حذف آن ها از دسترس سلول ها می گردد. در کنار این مزایا، مواردی از معایب سرم نیز باعث شده است حذف سرم در دستور کار محققین و برخی از تولید کننده های فراورده های حاصل از سلول قرار بگیرد مانند تفاوت خصوصیات انواع سرم تهیه شده از منابع مختلف جغرافیایی، شرایط خاص نگهداری و حمل ونقل (۱۲، ۱۳). هم چنین تخمین زده می شود که حدود ۵۰۰۰۰۰ لیتر سرم سالیانه تولید می شود (۷) که برای این منظور بیش از ۱۰۰۰۰۰۰ جنین گاو سالیانه باید کشته شوند (۹) و هم چنین به علت افزایش توسعه و استفاده از روش های آزمایشگاهی مثل لقاح آزمایشگاهی، کلونینگ، تست های سمیت و ایجاد حیوانات دست کاری شده، انتظار می رود در سال های آینده استفاده از سرم افزایش پیدا کند (۱۷). سلول هایی که در محیط های حاوی سرم حیوانی کشت و نگهداری می شوند را نمی توان به راحتی مورد استفاده قرار داد زیرا سرم با منشاء حیوانی به عنوان یک ماده آنتیژنیک غیر گونه ای برای سیستم ایمنی انسان می باشد و منجر به ایجاد واکنش های شدید ایمونولوژیک می گردد (۱۴). از سوی دیگر حضور سرم در محیط سلول ها باعث ایجاد اسید سیالیک غیر انسانی (Neu-5Gc) در سطح سلول ها می شود و این ماده به عنوان آنتی ژن منجر به تولید آنتیبادی هایی می گردد که می توانند منجر به تحریک سیستم کمپلمان شوند (۱۱). علاوه بر این، سرم می تواند یکی از عوامل آلودگی باشد و امکان وجود عوامل مضر شناخته شده و ناشناخته نظیر ویروس، پریون و مایکوپلاسما در سرم وجود دارد، بنابراین برای تولید محصولات دارویی و به منظور اجتناب از آلودگی باید از محیط های کشت فاقد سرم استفاده گردد. استفاده از سرم نه تنها هزینه بر است، بلکه باعث افزایش مخارج مربوط به جداسازی پروتئین های سرم از محصول نهایی نیز می شود و استخراج و خالص سازی محصول اصلی و نهایی کشت را مشکل می کند .امروزه استفاده از محیط کشت های تجاری خاصی که نیاز به افزودن سرم ندارند رایج شده است که می تواند به طور اختصاصی برای هر رده سلولی استفاده شود. این محیط ها برای کشت سلول هایی که محصولات ترشحی آن ها کاربرد بالینی دارد مثل تولید آنتی بادی های مونوکلونال و پروتئین های نوترکیب با کاربرد درمانی استفاده می شوند (۵ ، ۳). فلوسیتومتری تکنیکی است که چندین ویژگی فیزیکی ذره های خاص (به طور معمول سلول ها) را همان طور که در جریان مایع در حال حرکت هستند، از طریق یک پرتو نوری (لیزر) نخست اندازه گیری و سپس تجزیه و تحلیل می کند. در طی سال های اخیر کاربردهای فلوسیتومتری در تمام شاخه های علم زیست شناسی گسترده شده است. بیش ترین رشد در استفاده از فلوسیتومتری در زمینه کارهای بالینی بوده است. فلوسیتومترها علاوه بر کاربرد بسیار زیاد در علوم پایه و کارهای تحقیقی، امروزه برای اندازه گیری های روتین در ایمونولوژی، هماتولوژی و به میزان کم تری در پاتولوژی نیز استفاده می شوند. چندین رنگ فلورسنت وجود دارند که قابلیت اتصال به DNA را دارند. این رنگ ها خاصیت فلورسانس ضعیفی در محلول های آبی دارند، اما هنگامی که به DNA متصل می شوند، خاصیت فلورسانس قوی پیدا می کنند. رنگ عمده ای که کاربرد گسترده ای دارد پروپیدیوم یدید (PI) است. PI در بین زنجیره های دو رشته ای اسیدنوکلئیک قرار میگیرد و توسط لیزر آرگون در طول موج ۴۸۸ nm تحریک می شود و نور فلورسانس قرمز را از خود پراکنده می سازد؛ و چون از ورود این رنگ توسط سلول های زنده به داخل جلوگیری می شود، یک راه تشخیص سلول های زنده از مرده (زیستایی سلول ها)، استفاده از همین رنگ است (۱).

هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر کشت سلول های CHO در محیط فاقد سرم و هم چنین تاثیر کاهش میزان سرم در محیط کشت بر تولید پروتئین نوترکیب، مورفولوژی و زیستایی سلول ها به منظور تلاش برای کشت سلول ها در محیط فاقد سرم می باشد.

مواد و روش ها

کشت سلولی: در این مطالعه تجربی به‌منظور بررسی تاثیر سرم در محیط کشت بر مورفولوژی، زیستایی[5] و میزان تولید پروتئین نوترکیب، از سلول های تخمدان همستر چینی (CHO) که توسط پلاسمید pSeqTaq/GHWT حاوی ژن hGH تحت کنترل پروموتور سایتومگالوویروس

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]

(CMV) ترانسفکت شده بود استفاده شد. به منظور رشد و نگهداری سلول ها، از محیط Dulbecco's Modifica-tion of Eagle's Medium/Hams F12 (DMEM/Ham's F12) (از شرکت GIBCO، آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS (Fetal Bovine Serum) (از شرکت GIBCO، آمریکا)، ۱ درصد مخلوط آنتی بیوتیک پنیسیلین-استرپتومایسین (Sigma، آمریکا) و در شرایط ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت قرار داده شدند. به منظور کنترل شرایط کشت سلولی و تولید پروتئین در سلول های نوترکیب از سلول های CHO فاقد هرگونه پلاسمید استفاده شد که در اینجا به منظور تمایز از سلول هایCHO ترانسفکت شده با پلاسمید pSeqTaq/GHWT به صورت nCHO نشان داده می شوند.

همان طور که در گذشته بحث شد، به دلیل اختلال هایی که استفاده از سرم در محیط کشت سلولی ایجاد می شود، در این تحقیق تلاش شد سرم از محیط کشت سلولی حذف شود، به همین منظور تأثیر حضور سرم در محیط کشت سلولی بر مورفولوژی، رشد سلول و تولید GH بررسی شد.

در کلیه مراحل این تحقیق، کشت سلول ها در محیط DMEM/ Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم به عنوان حالت کنترل در نظر گرفته می شود و سایر شرایط با آن مورد مقایسه قرار میگیرد.

کاهش میزان سرم محیط کشت

در این روش ابتدا کشت سلول ها در محیط کشت حاوی ۱۰% سرم شروع شد و در هر مرحله بعد از هر پاساژ این میزان به نصف کاهش یافت تا به مقدار ۲۵/۱% در محیط کشت رسید. به همین منظور بعد از رشد سلول ها در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم سلول ها به محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۵% سرم انتقال داده شدند. بعد از رشد و سازگار شدن سلول ها به این محیط، انتقال سلول ها به محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۵/۲% سرم انجام گرفت و در نهایت با رشد و سازگار شدن سلول ها به محیط حاوی ۵/۲% سرم، سلول ها به محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۲۵/۱% سرم انتقال پیدا کردند و در هر مرحله میزان تولید پروتئین نوترکیب rhGH، مورفولوژی سلول ها و تاثیر سرم بر میزان چسبندگی آن ها و زیستایی سلول ها بررسی شد.

آزمایش در فلاسک کشت سلولی T-25 و با تکرار سه تایی انجام شد. برای انجام این آزمایش بعد از شمارش سلول ها، به هر فلاسک $2\times Cell/ml10^5$ حاوی محیط کشت مورد نظر اضافه شد و در انکوباتور با شرایط ٪۵ دی اکسید کربن، دمای۳۷°C و حاوی رطوبت قرار داده شد تا سلول ها در این شرایط رشد کنند سپس سلول ها پاساژ داده شده و به محیط جدید منتقل شدند. در هر مرحله محیط رویی سلول ها برداشت شد و به منظور بررسی میزان تولید rhGH در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در هر مرحله سلول ها ۲-۳ بار پاساژ داده شدند و زمانی که به محیط جدید با درصد سرم کم تر منتقل می شدند درصورتی که سلول ها با محیط جدید سازگاری نشان نمی دادند به محیط کشت مرحله قبل منتقل می شدند.

انتقال مستقیم سلول ها به محیط فاقد سرم

در مرحله بعد سلول ها بعد از رشد در محیط حاوی ۱۰% سرم تعدادی از سلول ها به طور مستقیم به محیط SFM و تعدادی به محیط DMEM/Ham's F12 فاقد سرم و تعدادی به محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم منتقل شدند و میزان تولید پروتئین نوترکیب rhGH و زیستایی سلول ها بررسی و مقایسه شدند.

این آزمایش در فلاسک کشت سلولی T-25 و با تکرار سه تایی انجام شد. برای انجام این آزمایش بعد از شمارش سلول ها، به هر فلاسک 2×10^5 Cell/ml حاوی محیط کشت مورد نظر اضافه شد و در انکوباتور با شرایط ۵% دی اکسید کربن، دمای ۳۷ °C و حاوی رطوبت قرار داده شد تا سلول ها در این شرایط رشد کنند. به منظور بررسی رشد سلول ها در محیط فاقد سرم، از محیط فاقد سرم SFM (SFM4CHO DPM(SH30518); Hyclone) حاوی گلوتامکس (Sigma، آمریکا)، پلورونیک (Pluronic-F68) (Sigma، آمریکا) و سدیم بی کربنات (Merck، آلمان) استفاده شد.

بررسی غلظت rhGH تولید شده به‌روش الایزا

به منظور بررسی تولید هورمون رشد انسانی در سلول های CHO در محیط کشت با درصد های مختلف سرم از روش اختصاصی ساندویچ الایزا استفاده شد. برای این منظور به‌هر چاهک پلیت ۹۶ خانه الایزا آنتی بادی اولیه بر ضد هورمون رشد اضافه شد و پلیت الایزا به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از سه بار شستشو با بافر PBS-T (از شرکت سیتو متین ژن، ایران) پلیت به‌صورت شبانه بلاکه شد و دوباره پس از ۳ مرتبه شستشو با بافر PBS-T غلظت های استاندارد با استفاده از هورمون رشد تجاری در PBS (از شرکت سیتو متین ژن، ایران) تهیه شدند و همراه با نمونه های پروتئین به‌صورت دوتایی به چاهک ها اضافه و به‌مدت دو ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس آنتی بادی ثانویه ضد GH نشاندار با بیوتین به‌هر چاهک اضافه شد. پس از یک ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و سه مرحله شستشو با بافر PBS-T،HRP-Streptavidin به‌هر چاهک اضافه شد و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از شستشو، ۱۰۰

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]

میکرولیتر TMB (از شرکت سیتو متین ژن، ایران) به هر چاهک اضافه و زمانی که تغییر رنگ مناسبی ایجاد شد، محلول متوقف کننده (از شرکت سیتو متین ژن، ایران) به هر چاهک اضافه و جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

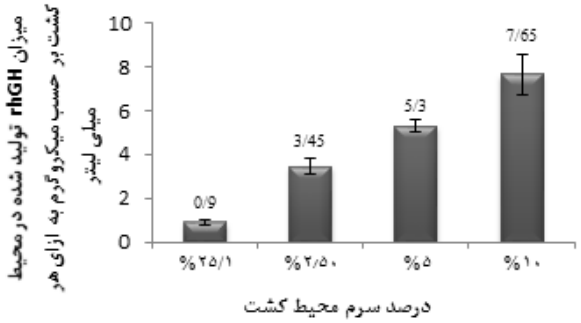
بررسی تاثیر سرم بر میزان زیستایی سلول ها

به منظور تعیین اثر و مقایسه محیط فاقد سرم SFM و محیط کشت کامل DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم بر میزان زیستایی سلول ها و مرگ و میر سلول ها، پس از کشت سلول های CHO در هر دو نوع محیط با روش رنگ آمیزی با پروپیدیوم یوداید (PI) و به کمک دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش کشت سلول های CHO/GHWT در فلاسک های T-25 در دو نوع محیط کشت DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرمFBS و محیط فاقد سرم انجام شد. به همین منظور سلول ها به مدت ۳ روز در انکوباتور قرار داده شدند سپس شستشوی سلول ها با PBS، تریپسینه کردن سلول ها توسط Trypsin/EDTA (از شرکت سیتو متین ژن، ایران) و سانتریفوژ به ترتیب انجام گرفت و پلاک سلولی در ۱ میلی لیتر PBS حل شد. µlit ۵ از محلول PI ۵ mg/ml به µlit ۱۰۰ از سوسپانسیون سلولی افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای C° ۳۷ انجام گرفت.۲ میلی لیتر PBS به هر لوله اضافه شد و سلول ها به طور کامل مخلوط شدند. لوله ها به مدت ۶ دقیقه در g ۶۰۰ سانتریفوژ شدند و محیط رویی حذف و پلاک سلولی در ۱ میلی لیتر PBS حل شد و در نهایت نتایج به کمک دستگاه فلوسایتومتری خوانده شد.

یافته ها

بررسی تاثیر میزان سرم محیط کشت بر تولید rhGH

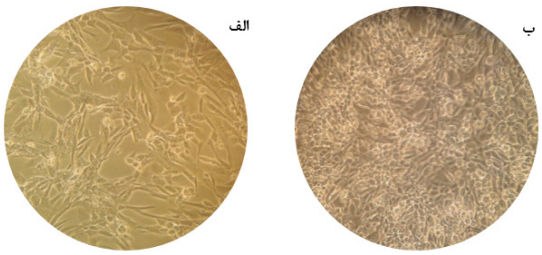
همان طور که در شکل ۱ نشان داده شده است با بررسی تاثیر غلظت FBS در محیط کشت بر تولید پروتئین توسط سلول های CHO مشخص شد میزان تولید rhGH با درصد سرم در محیط کشت ارتباط مستقیم دارد و با کاهش میزان سرم محیط کشت میزان تولید rhGH نیز کاهش یافت.



شکل ۱- نمودار مقایسه میزان rhGH تولید شده در محیط حاوی غلظت مختلف سرم: با کاهش درصد سرم میزان تولید نیز کاهش یافته است.

بررسی تاثیر کاهش سرم محیط کشت بر مورفولوژی و میزان چسبندگی سلول ها

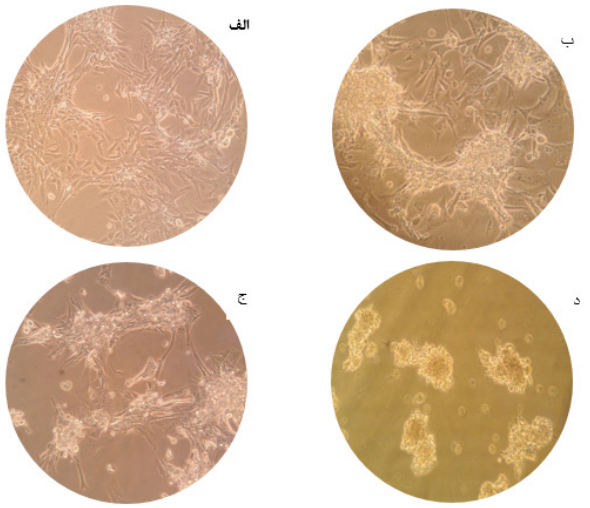
با بررسی تاثیر میزان سرم در محیط کشت مشاهده شد با کاهش سرم در محیط کشت، رشد سلول ها کاهش یافته و سلول ها تمایل به جدا شدن از سطح پلیت و تشکیل حالت توده ای را پیدا می کنند. شکل ۲ و شکل ۳ مراحل رشد سلول ها در محیط کامل حاوی ۱۰% سرم را با محیط هایی که میزان سرم در آن ها کاهش یافته مورد مقایسه قرار می دهند. قسمت (الف) از شکل ۲ مربوط به سلول هایی است که در محیط کامل حاوی ۱۰% سرم رشد یافته اند و همان طور که مشاهده می شود زمانی که تراکم سلولی به حداکثر خود رسید سلول ها تمام سطح پلیت را می پوشانند و به علت ممانعت تماسی بین سلول ها و کاهش مواد غذایی، مرگ سلولی اتفاق می افتد و سلول ها تک تک از سطح پلیت جدا می شوند که این سلول ها سلول هایی هستند که مرده اند. شکل ۳ مربوط به سلول هایی است که در محیط هایی که میزان سرم در آن ها کاهش یافته رشد نموده اند. در این حالت زمانی که تراکم سلولی به ۷۰-۸۰% می رسد سلول ها شروع به جمع شدن می کنند و تشکیل حالت توده ای می دهند. این حالت ادامه پیدا می کند تا زمانی که سلول ها به طور کامل از سطح پلیت جدا شوند که در این حالت سلول ها زنده اند اما درصد زنده بودن آن ها در مقایسه با سلول هایی که در محیط کامل حاوی ۱۰% سرم هستند کاهش پیدا می کند.



شکل ۲- مورفولوژی سلول ها در محیط کشت حاوی ۱۰% سرم (حالت کنترل): بعد از رشد کامل سلول ها و پر شدن سطح فلاسک سلول هایی که به علت ممانعت تماسی و کمبود مواد غذایی و تولید مواد سمی میمیرند از سطح پلیت جدا می شوند. الف) زمانی که تراکم سلولی به حداکثر نرسیده و ب) زمانی که سطح پلیت کشت سلولی پر شده و مرگ سلولی رخ داده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

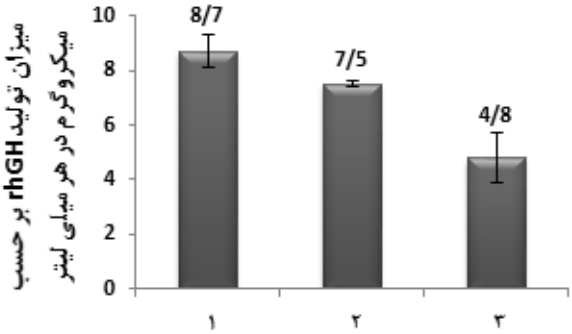
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]



شکل ۳. سلول های رشد کرده در محیط کشت هایی که سرم آن ها کاهش یافته: در محیط کشت DMEM/Ham's F12 که مقدار سرم آن ها کاهش یافته سلول ها تمایل دارند از سطح پلیت جدا شده و میزان چسبندگی آن ها به فلاسک کاهش یافته است. شکل الف تا د مراحل رشد سلول ها در فلاسک و جدا شدن آن ها و ایجاد حالت clump در محیط با سرم کاهش یافته را نشان می دهد.

بررسی میزان تولید rhGH در محیط کشت های مختلف به روش الایزا

به منظور مقایسه تاثیر میزان سرم در محیط کشت DMEM/ Ham's F12 بر تولید rhGH و مقایسه با محیط فاقد سرم SFM تست الایزا انجام شد. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود میزان تولید rhGH در محیط DMEM/Ham's F12 فاقد سرم نسبت به محیط کشت DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم کاهش زیادی داشت است اما در محیط فاقد سرم SFM میزان تولید پروتئین نوترکیب rhGH کم تر اما نزدیک به محیط کشت DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم می باشد.



شکل ۴- نمودار نتایج سازگاری مستقیم سلول ها به محیط SFM؛ ۱) سلول های رشد کرده در محیط DMEM/Ham's F12، حاوی ۱۰% سرم، ۲. انتقال مستقیم سلول ها به محیط SFM ، ۳. انتقال سلول ها به محیط DMEM/Ham's F12 فاقد سرم

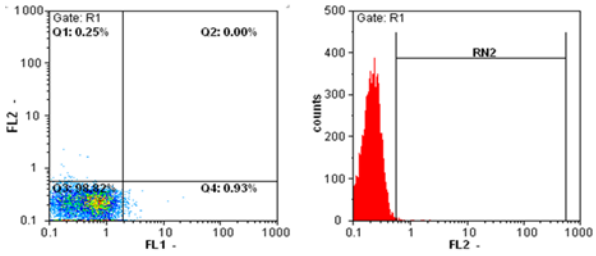
بررسی تأثیر محیط کشت SFM بر میزان زیستایی سلول ها و مقایسه با محیط کشت حاوی سرم به روش فلوسایتومتری تعیین اثر محیط فاقد سرم SFM و محیط کشت کامل DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم بر میزان زیستایی سلول ها و مرگ و میر سلول ها، پس از کشت سلول های CHO در هر دو نوع محیط با روش رنگ آمیزی با پروپیدیوم یداید (PI) و به کمک دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود میزان زیستایی سلول های رشد کرده در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم به مدت سه روز، ۸۲/۹۸% می باشد و طبق شکل ۶ میزان زیستایی سلول های رشد کرده در محیط SFM ۷/۸۸% است. سلول های رشد کرده در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم میزان FL2 بیش تری در مقایسه با سلول های رشد کرده در محیط SFM دارند که نشان دهنده زیستایی بیش تر سلول ها در محیط DMEM/ Ham's F12 حاوی ۱۰% سرم دارد. با این حال به این علت که میزان زیستایی سلول ها در محیط SFM بالای ۸۰% است این میزان قابل قبول است.

بحث:

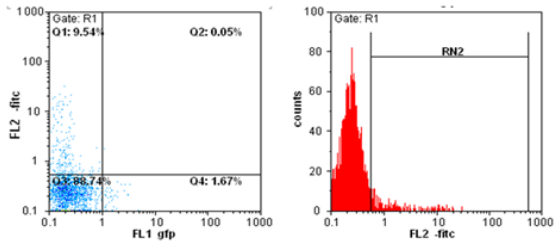
سرم برای نگهداری، تکثیر و تمایز سلول های انسانی و حیوانی در محیط کشت لازم است. FBS مخلوط پیچیده ای از فاکتورهای مختلف است و حاوی ترکیبات زیادی مثل فاکتورهای رشد، پروتئین، ویتامین، عناصر ضروری، هورمون، فاکتورهای چسبندگی و غیره می باشد که برای رشد و نگهداری سلول ها ضروری است (۱۵). ولی با این وجود استفاده از سرم به چندین دلیل چالش برانگیز است که از آن جمله می توان به هزینه بالا، مداخله در خالص سازی محصولات نوترکیب و امکان آلودگی های ویروسی و غیره اشاره کرد (۱۰). به همین دلیل به منظور حذف سرم از محیط کشت، در این تحقیق سعی بر این بوده است تاثیر سرم و حذف آن در محیط کشت بر میزان تولید پروتئین rhGH بود به صورتی که سلول ها در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% FBS بیش ترین میزان تولید پروتئین rhGH را داشتند و در محیط DMEM/Ham's F12 فاقد سرم میزان تولید rhGH به میزان زیادی کاهش یافت. اما در محیط تجاری فاقد سرم SFM میزان تولید rhGH به میزان تولید این پروتئین در محیط DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰% FBS نزدیک بودکه نشان می دهد محیط SFM جایگزین مناسبی برای محیط DMEM/Ham's F12 حاوی سرم می باشد. هم چنین در پژوهشی مشابه در سال ۲۰۱۳ توسط رضایی و همکاران تأثیر حضور سرم در محیط کشت بر تولید rhGH بررسی و تأثیر آن در افزایش تولید rhGH اثبات گردید (۱۵). در مطالعه ای در سال ۲۰۰۹، تاثیر میزان سرم محیط کشت بر رشد سلول های HeLa S3 و متابولیسم آن ها مورد بررسی قرار گرفت. افزایش

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]

غلظت سرم از ۵ تا ۲۰ درصد در محیط کشت Ham's F12 باعث افزایش زیستایی سلول ها شد. به عبارت دیگر میزان ۵ تا ۲۰ درصد سرم در محیط کشت باعث افزایش مصرف گلوکز و تولید لاکتات می شود (۶).



شکل ۵- دیاگرام حاصل از رنگ آمیزی سلول های **CHO** با **PI**؛ نشان دهندهی درصد سلول های مرده نسبت به کل سلول ها در محیط کشت **DMEM/Ham's F12** حاوی ۱۰% سرم. دیاگرام نشان می دهد ۸۲/۹۸% از سلول ها زنده اند.



شکل ۶- نمودار حاصل از رنگ آمیزی سلول های **CHO** با **PI**؛ نشان دهندهی درصد سلول های مرده نسبت به کل سلول ها در محیط کشت **SFM**. دیاگرام نشان می دهد ۷۴/۸۸% از سلول ها زنده اند.

به منظور بررسی محیط کشت SFM بر روی توانایی زنده ماندن سلول های CHO و مقایسه با محیط کشت حاوی سرم، این سلول ها با PI مجاور شدند. PI از جمله رنگ های فلورسنت معمولی است که به منظور بررسی زیستایی سلول به کار می رود. در صورت مرگ سلول، PI به DNA آن متصل شده و باعث افزایش تولید نور فلورسنت قرمز و در نتیجه افزایش میزان FL2 در نتایج خوانده شده با دستگاه فلوسایتومتری می شود.که نتایج حاکی از کاهش درصد زنده بودن سلول ها در محیط SFM نسبت به محیط DMEM/Ham's حاوی ۱۰% FBS بود. سرم حیوانی سرشار از فاکتورهای رشد، هورمون ها، پروتئین های حامل، عناصر ضروری و مواد ناشناخته دیگری است که در حضور آن سلول ها قدرت حیات و تکثیر بسیار بیشتری پیدا می کنند، در شرایطی که سرم حیوانی در محیط نگهداری سلول حضور نداشته باشد درصد زنده ماندن[1] به طور چشم گیری کاهش می یابد (۱۳). میزان زیستایی سلول ها در محیط DMEM/Ham's F12DMEM-F12 فاقد سرم کاهش چشم گیری نشان میداد اما در محیط فاقد سرم SFM کاهش کم تری در میزان زیستایی سلول ها نشان می دهد. هم چنین در این تحقیق با بررسی تأثیر سرم بر میزان رشد و مورفولوژی سلول ها مشاهده شد هر اندازه میزان سرم در محیط DMEM/ Ham's F12 کاهش پیدا می کند میزان رشد سلول ها نیز کاهش یافته و به آهستگی صورت میگیرد. زمانی که سرم به مقدار ۲۵/۱% رسید رشد سلول ها به میزان چشم گیری کاهش یافت و با کاهش سرم به کم تر از این میزان رشد سلول ها به طور کامل متوقف شد. از نظر مورفولوژی سلول ها، در محیط کشت هایی که سرم آن ها کاهش یافته بود پس از چند روز، به تدریج سلول ها تمایل پیدا می کردند از سطح فلاسک جدا شوند و حالت توده ای پیدا می کردند که در این حالت با بررسی توسط رنگامیزی تریپان بلو و فلوسایتومتری مشخص شد سلول ها زنده اند (داده ها نشان داده نشده است). سلول هایی است که در محیط کامل حاوی ۱۰% سرم رشد یافته اند در طی مراحل رشد تمام سطح پلیت را پوشانده و زمانی که تراکم سلولی به حداکثر خود رسید به علت ممانعت تماسی بین سلول ها و کاهش مواد غذایی، مرگ سلولی اتفاق می افتد و سلول ها تک تک از سطح پلیت جدا می شوند. با توجه به این مطلب که سرم مخلوط بسیار پیچیده ای از ترکیبات مختلف از جمله فاکتورهای چسبندگی، پپتیدها، مواد غذایی ضروری و هورمون ها می باشد که برای کشت و تکثیر سلول ها ضروری می باشد و نتیجه کاهش سرم در محیط کشت باعث کاهش این فاکتورها از جمله فاکتور چسبندگی خواهد شد که علت جدا شدن سلول ها در محیط کشت هایی که سرم آن ها کاهش یافته را توجیه می کند.

نتیجه گیری

به دلیل اختلال هایی که استفاده از سرم در محیط کشت سلولی ایجاد می کند به منظور حذف سرم از محیط کشت سلول های CHO، برای تولید محصولات دارویی و به منظور اجتناب از آلودگی در این مطالعه سعی شد از محیط های کشت فاقد سرم SFM استفاده گردد و تاثیر آن بر میزان تولید پروتئین نوترکیب rhGH، مورفولوژی سلول ها و زیستایی سلول ها بررسی گردد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان دهنده این مطلب بود که محیط های کشت فاقد سرم SFM جایگزین مناسبی برای محیط کشت حاوی سرم می باشند. در محیط SFM در مقایسه با محیط کشت حاوی FBS با وجود اینکه سلول های CHO تمایل به جدا شدن از سطح پلیت را از خود نشان می دهند اما از نظر زیستایی و میزان تولید پروتئین نوترکیب rhGH تفاوت قابل توجهی نشان نمی دهند. از این رو برای تولید پروتئین های نوترکیب دارویی، محیط کشت SFM برای سلول های جانوری، گزینه مناسبی برای جایگزینی با محیط کشت حاوی سرم می باشند.

1- Viability

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]

سپاسگزاری

مطالعه علمی پژوهشی حاضر حاصل پایان نامه خانم زهرا سادات عقیلی در رشته بیوتکنولوژی میکروبی در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی جناب آقای دکتر سید حمید زرکش اصفهانی می باشد که با حمایت دانشگاه اصفهان اجرا شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]

منابع

۱. زرکش اصفهانی سید حمید، اعتمادی فر زهرا. اصول فلوسیتومتری و کاربرد آن در علوم زیستی، دانشگاه اصفهان، ۱۳۸۹، ۱۸۰ صفحه.

2. Barnes LM, Bentley CM, Dickson AJ. 2003. Stability of protein production from recombinant mammalian cells. Biotechnol Bioeng., 81: 631-639.
3. Bradley R. 2004. Bovine spongiform encephalopathy and its relationship to the variant form of Creutzfeldt-Jakob disease. Contributions to Microbiology 11:146-185.
4. Davis JM. 1994. Basic Cell Culture A Practical Approach. Oxford University Press.
5. Ferruzza S, Rossi C, Sambuy Y, Scarino ML. 2013. Serum-reduced and serum-free media for differentiation of Caco-2 cells. Altext 30:159-168.
6. Hesham A, Ensahsy EL, Abdeen A, Abdeen SH,Elsayed A. 2009. Serum Concentration Effects on the Kinetics and Metabolism of HeLa-S3 Cell Growth and Cell Adaptability for Successful Proliferation in Serum Free Medium. World Applied Sciences J 6: 608-615.
7. Hodgson J. 1995. To treat or not to treat: that is the question for serum. Bio/Technology 13: 333–334.
8. Jayapal KP, Wlaschin KF. 2007. Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. Chemical Engineering Progress 103:40-47.
9. Jochems CE, van der Valk JB, Stafleu FR, Baumans V. 2002. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Alternatives to Laboratory Animals 30: 219–227.
10. Liu CH, Chang TY. 2006. Rational development of serum-free medium for Chinese hamster ovary cells. Process Biochemistry 41: 2314–2319.
11. Martin M.J, Muotri A, Gage F, Varki A. 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. Nature Medicine 11:228-232
12. Merten OW, Kallel H, Manuguerra JC, et al. 1999. The new medium MDSS2N, free of any animal protein supports cell growth and production of various viruses. Cytotechnology 30: 191-201.
13. Merten OW, Kierulff JV, Castignolles N, Perrin P. 1994. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biological: use of various cell lines. Cytotechnology 14: 47-59.
14. Muller P, Aurich H, Wenkel R, Schäffner I, Wolff I, Walldorf J, Fleig WE, Christ B. 2004. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. Cell and Tissue Research 317:45-56.
15. Rezaei M, Zarkesh-Esfahani SH, Gharagozloo M. 2013 .The effect of different media composition and temperatures on the production of recombinant human growth hormone by CHO cells. Research in Pharmaceutical Sciences8:211-217 ; ..
16. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, Lindl T, Noraberg J, Price A, Scarino ML, Gstraunthaler G. 2010. Optimization of chemically defined cell culture media replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. Toxicol In Vitro 24:1053-1063.
17. van der Valk J, Mellor D, Brands R, Fischer R, Gruber F, Gstraunthaler G, Hellebrekers L, Hyllner J, Jonker FH, Prieto P, Thalen M, Baumans V.2004 . The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. Toxicol In Vitro 18:1-12.
18. Yoon SK, Hong JK. 2006. Adaptation of Chinese hamster ovary cells to low culture temperature: cell growth and recombinant protein production. J of Biotechnology122: 463-472.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1395.6.24.10.9]