دوفصلنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
مرکز تحقیقات طب گرمسیری و عفونی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال دوازدهم، شماره ۱، صفحه ۲۳ - ۱۷ (شهریور ۱۳۸۸)

تولید یک کلون از یاخته‌های پایدار کلیه گوساله و ارزیابی حساسیت آن در برابر ویروس‌های پاراآنفولانزا تیپ سه و هرپس سیمپلکس تیپ یک

یاشار محمدزاده صدیق[۱]، دکتر محمد حسن روستایی[۲]، دکتر حوریه سلیمان جاهی[۳]*، عباس بختیاری[۴]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] استاد گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] استادیار گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۴] کارشناس ویروس‌شناسی، بخش ویروس‌شناسی دام، موسسه واکسن و سرم سازی رازی

چکیده

زمینه: مطالعه حاضر جهت تولید کلون از یاخته‌های مداوم کلیه گوساله و ارزیابی حساسیت کلون‌های سلولی تولید شده در تکثیر ویروس‌های پاراآنفولانزا تیپ سه و هرپس سیمپلکس تیپ یک به منظور به‌کارگیری آن‌ها در تولید بذر ویروس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش با روش تهیه رقت‌های متوالی و با بهره‌گیری از رده سلولی Vero غیرفعال شده به عنوان لایه تغذیه‌کننده اقدام به کلون کردن یاخته‌های رده کلیه گوساله (BK) شد. پس از ظهور کلون‌های سلولی با حذف لایه تغذیه‌کننده، سلول‌های تازه جوانه‌زده از یک کلون جدا شدند و در شرایط مناسب کشت داده شدند. رده سلولی به دست آمده از لحاظ تکثیر ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ یک (به عنوان DNA ویروس) و پاراآنفولانزا تیپ سه (به عنوان RNA ویروس) قبل و بعد از کلون‌سازی یاخته‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج حاصل از کلون‌سازی یاخته‌های BK دراین تحقیق نشان داد که تغییر عیار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک بر روی یاخته‌های BK (قبل و بعد از کلون‌سازی) معنی‌دار نبود، اما اختلاف تکثیر ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه بر روی رده BK-O (قبل از کلون‌سازی) و BK-C (بعد از کلون‌سازی) از لحاظ آماری معنی‌دار بود. لذا رده‌های فوق قبل و بعد از کلون‌سازی از لحاظ کاریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند و نشان داده شد که سلول‌های کلون‌شده نسبت به سلول‌های کلون نشده هم از نظر مورفولوژی و هم از لحاظ کاریولوژی همگن‌تر هستند.

نتیجه‌گیری: یاخته‌های کلون شده BK در مقایسه با یاخته‌های کلون نشده دارای کاریوتیپ منظم‌تر بوده و حساسیت آن به ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه کمتر از یاخته کلون نشده بود.

واژگان کلیدی: کلون‌سازی، یاخته‌های BK، ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، ویروس پاراآنفولانزا تیپ ۳، کاریوتیپ

دریافت مقاله: ۸۶/۷/۳- پذیرش مقاله: ۸۶/۱۰/۲۲

* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس شناسی، ص پ: ۱۱۱-۱۴۱۱۵

Email :Soleim_h@modarres.ac.ir

مقدمه

استفاده از کشت یاخته برای تکثیر و تعیین هویت بسیاری از ویروس‌ها از جمله روش‌هایی است که در تمام آزمایشگاه‌های ویروس‌شناسی و تولید واکسن‌های ویروسی در جهان مرسوم است (۱). یکی از مهم‌ترین فاکتورهایی که در زمان بهره‌گیری از یاخته‌های پستانداران در ویروس‌شناسی باید به آن توجه کرد این است که یاخته‌ها باید حداکثر همسانی را داشته باشند (۲). برای به‌دست آوردن یاخته‌های یکنواخت از روش کلون‌سازی یاخته استفاده می‌شود (۲ و ۳). انواع یاخته‌ها را می‌توان در یک دسته‌بندی به سه قسمت مجزا از هم تقسیم کرد، یاخته‌های اولیه، یاخته‌های دیپلوئید یا نیمه مداوم و رده‌های مداوم (یاخته‌های نامیرا) که یاخته‌های آنوپلوئیدی (aneuploid) هستند که پاساژهای نامحدودی را تحمل می‌نمایند. این یاخته‌ها ثبات ژنتیکی ندارند (۲) و در نتیجه می‌توانند به‌طور مداوم رشد و تکثیر یابند و نتیجه آن پیدایش انواعی از یاخته‌های ناهمگن در کشت است. کلون به جمعیتی از یاخته‌ها اطلاق می‌شود که همگی از یک یاخته مادری واحد منشاء گرفته‌اند (۳) و کلون‌سازی برای به حداقل رساندن تنوع ژنتیکی و فنوتیپی در جمعیتی از یاخته‌ها بکار گرفته می‌شود. در مورد کلون‌سازی باید اشاره کرد که کلون‌سازی همگن بودن نسل‌های بعدی از رده‌های کلون شده را تضمین نمی‌کند. بسیاری از یاخته‌ها در کشت از نظر فنوتیپی هتروژن هستند و گاهی این یک صفت ذاتی است و حتی با کلون سازی‌های پی در پی نمی‌توان آنرا حذف کرد. نکته دیگر این‌که کلون‌سازی مستلزم تکثیر یاخته‌ها در تعداد کم می‌باشد و این یک مورد غیرفیزیولوژیک است. برای جبران این اشکال در کلون‌سازی از کشت تک لایه رده بخصوصی که غیرفعال شده‌است و توانایی تکثیر ندارد به‌عنوان لایه تغذیه‌کننده استفاده می‌شود. برای کلون کردن یاخته‌ها روش‌های متعددی وجود دارد که روش تهیه رقت از روش‌های پر کاربردی است که بدین منظور استفاده می‌شود. این روش براساس تهیه رقت‌های متوالی از یاخته‌ها و تکثیر یاخته‌های موجود در بالاترین رقت‌ها استوار است، بنابراین دقت این روش به تعداد یاخته‌هایی بستگی دارد که در ظرف چند خانه‌ای توزیع می‌گردد.

مواد و روش‌کار

کشت یاخته‌ها: یاخته‌های کلیه گوساله BK[1] (مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) و Vero (بانک سلولی انستیتو پاستور) در محیط DMEM[2] غنی‌شده با ۷ درصد سرم کشت داده شدند. بدین منظور به محیط کشت یاخته‌ها جنتامایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، پنی-سیلین (۱۰۰ واحد بر لیتر) و استرپتومایسین (۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) اضافه شد. غلظت بی‌کربنات‌سدیم محیط کشت برای ۵ درصد دی‌اکسید کربن موجود در فاز گازی انکوباتور تنظیم گردید و محیط کشت با فیلتر فشار مثبت استریل شد (۳-۱).

یاخته‌های BK در ابتدا به محیط کشت DMEM عادت داده شدند و کشت یاخته بر اساس روش‌های رایج انجام شد (۳). برای شمارش یاخته‌ها از لام نئوبار و روش استاندارد استفاده شد (۴ و ۵). برای انجماد یاخته‌ها از مخلوط DMSO[3] و سرم به غلظت ۱۰ درصد از DMSO استفاده شد. یاخته‌های فریز شده درون لوله‌های کرایو در فریزر ۷۰- درجه

[1] Bovine Kidney
[2] Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium
[3] Dimethyl sulfoxide

سانتی‌گراد و تانک ازت مایع نگهداری شدند.

تکثیر ویروس‌ها: برای تکثیر ویروس‌های هرپس سیمپلکس تیپ یک (ایزوله ایران-تربیت مدرس) و پاراآنفولانزا تیپ سه (ایزوله ایران-موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) از تک لایهٔ یاخته‌های BK استفاده شد. بدین منظور ویروس‌ها با MOI=۰/۱[4] به یاخته‌هایی که ۷۰ درصد سطح فلاسک را پوشانده بودند اضافه گردید و پس از سپری شدن یک‌ساعت جذب بر روی یاخته‌ها تعلیق ویروسی جذب نشده خارج و محیط DMEM اضافه شد و پس از تشکیل CPE[5] به میزان ۸۰ درصد ویروس‌ها جمع‌آوری و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تأیید وجود ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه از تست همادزورپشن با بهره‌گیری از تعلیق گویچه‌های قرمز ۰/۴ درصد خوکچه هندی نیز استفاده شد (۶).

کلون‌سازی: برای به دست آوردن کلون از یاخته‌های هدف، سوسپانسیون سلولی با رقت بسیار بالا تهیه شد و در مقادیر پایین بر روی لایه تغذیه کننده (feeder layer) کشت داده شدند. سپس کلونی‌های حاصل از رشد یاخته‌ها به ظروف بزرگتر انتقال داده شد تا در نهایت یک رده همگنی از یاخته‌ها حاصل آید. برای تهیه لایه تغذیه‌کننده قبل از کلون سازی یاخته‌های Vero درون میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای به تعداد ۱۰۵ سلول بر میلی‌لیتر کشت داده شد، سپس با میتومایسین c (۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و زمان اثر دهی ۳ ساعت) یاخته‌های Vero غیرفعال شدند (۱۰-۷). برای کلون‌سازی با استفاده از رقت‌های متوالی از تعلیق یاخته‌های BK با فواصل ۱ لگاریتم تهیه و سپس (رقت ۰/۲۵ سلول بر میلی‌لیتر و ۰/۵ سلول بر میلی‌لیتر) درون چاهک‌های میکروپلیت ۲۴ خانه‌ای کشت داده شدند. پس از ظهور کلونی، برای برداشت کلنی از حلقه‌های کلونینگ[6] (۳ و ۶)، حذف لایه تغذیه‌کننده توسط EDTA ۰/۰۲ درصد (۱۱) و برداشت کلونی با کمک پی‌پت پاستور نازک شده استفاده شد (۳). برای تکثیر و زیادسازی سلول‌ها، کلونی‌های برداشت شده در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد، سپس بعد از تشکیل مونولایر کامل به ترتیب به میکروپلیت‌های ۲۴ خانه‌ای و ۶ خانه‌ای و در نهایت به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی انتقال داده شد. یک کلونی به طور اتفاقی انتخاب و تکثیر داده شد (BK-C) و سپس روند تکثیر ویروس‌های هرپس و پاراآنفولانزا تیپ سه بر روی آن‌ها برای مقایسه با یاخته‌های مادری (BK-O) به کار گرفته شد.

کاریو تایپینگ: برای تهیه کاریوتایپ از یاخته‌های BK، از کلشی‌سین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (۳ و ۱۷-۱۲). محلول هیپوتونیک از KCl تهیه و با غلظت ۷۵ میلی‌مولار به کار گرفته شد.

مقایسه قدرت تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و پاراآنفولانزا تیپ سه بر روی یاخته‌های BK-C و BK-O:

یاخته‌های BK-O و BK-C که از نظر تعداد سلول و سلامت یاخته‌ای هر دو در وضعیت مشابه به سر می‌بردند، انتخاب شدند. ابتدا، هر دو رده یاخته‌ای به طور هم‌زمان تریپسینه شدند و از آن‌ها تعلیق یاخته‌ای یکنواختی بدست آمد. شمارش یاخته‌ها انجام و تعداد یاخته‌های مساوی از هر دو رده بدست آمد و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی جدید توزیع شدند. به هر فلاسک حاوی تعداد یاخته شمارش شده ۶

[4] Multiplicity of infection
[5] Cytopathic effect
[6] cloning rings

میلی‌لیتر از محیط کشت دارای ۷ درصد سرم ریخته شد. حجم محیط کشت و نوع آن برای هر دو فلاسک نیز یکسان تهیه شده بود و برای هر دو فلاسک شرایط کاملاً یکسانی برای رشد یاخته‌ها در نظر گرفته شد. پس از ۸ ساعت که اکثر یاخته‌ها فقط امکان اتصال به سطح را یافته بودند و پس از خارج کردن محیط کشت هر دو فلاسک، میزان معین و مساوی از ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ به دو فلاسک واجد سلول تلقیح شد. مدت یک‌ساعت جذب ویروس به سطح یاخته‌ای برای هر دو فلاسک در نظر گرفته شد. پس از سپری شدن یک‌ساعت زمان جذب، سطح هر دو فلاسک با CMF-PBS[7] شستشو داده شد. مجدداً ۶ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی سرم نگهدارنده به فلاسک‌ها افزوده شد. در این هنگام به عنوان ساعت صفر از محیط افزوده شده به درون هر فلاسک به مقدار ۲ میلی‌لیتر نمونه‌گیری گردید و در لوله‌های جداگانه جمع‌آوری شد. مجدداً ۲ میلی‌لیتر محیط کشت استریل واجد سرم (۲ درصد) به فلاسک‌ها افزوده شد. نمونه‌های اول و دوم به فاصله ۴ ساعت پس از تلقیح و نمونه‌های بعد هر کدام به فاصله ۸ ساعت تهیه و به فریزر ۷۰- درجه انتقال داده شد و $TCID_{50}$[8] نمونه‌ها به طور همزمان اندازه‌گیری شد (۱۸). هنگام نمونه‌گیری وضعیت تشکیل CPE در فلاسک‌ها با معیار ۱+، ۲+، ۳+ و ۴+ ثبت گردید.

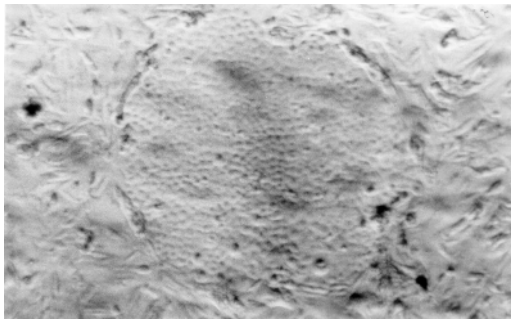
یافته‌ها

نتایج مربوط به کلون‌سازی یاخته‌های BK در جدول شماره ۱ در وضعیتی که ۰/۲۵ یاخته در هر چاهک وجود دارد نشان داده شده است،که بعد از گذشت ده روز به بیست و چهار یاخته و در روز پانزدهم به تعداد $۱۰^{۴-۵}$ یاخته رسیده بود.

جدول ۱: وضعیت تکثیر یاخته‌های BK هنگام کلون‌سازی

روز صفر	۰/۲۵ یاخته
روز نهم	۲۱ یاخته
روز دهم	۲۴ یاخته
روز یازدهم	۵۶ یاخته
روز دوازدهم	۶۸ یاخته
روز سیزدهم	۸۲ یاخته
روز چهاردهم	$۱۰^{۲}$ یاخته
روز پانزدهم	$۱۰^{۴-۵}$ یاخته
روز بیست و چهارم	برداشت کلونی به روش حذف لایه تغذیه کننده

همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود، در روز بیست و چهارم برداشت کلونی به روش حذف لایه تغذیه‌کننده انجام شد که نتایج حاصل از آن در شکل ۱ دیده می‌شود.

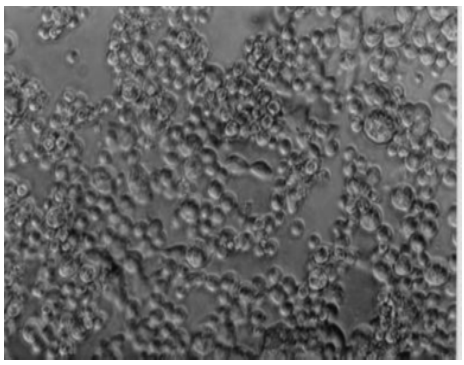


شکل ۱: کلون تکثیریافته روی لایه تغذیه کننده

عیار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در زمان تلقیح به سلول‌های مادری و کلون‌شده $TCID_{50}$، ۱۰۷/۸ محاسبه گردید و MOI استفاده شده در این تحقیق برای ارزیابی قدرت تکثیر ویروس بر روی یاخته‌های فوق (BK-C و BK-O) برابر با ۰/۲ محاسبه شد. همان‌طورکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در ۳۲

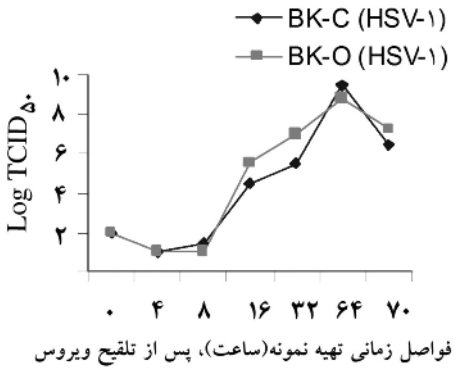
[7] Calcium Magnesium Free - Phosphate Buffered Saline
[8] %50 Tissue Culture Infectious Dose

ساعت بعد از عفونت زایی به اوج خود می‌رسد و متعاقب آن آثار تخریب سلولی (CPE) در سلول‌ها مشاهده می‌شود.



شکل ۲: آثار تخریب سلولی (CPE) در سلول‌ها ناشی از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک

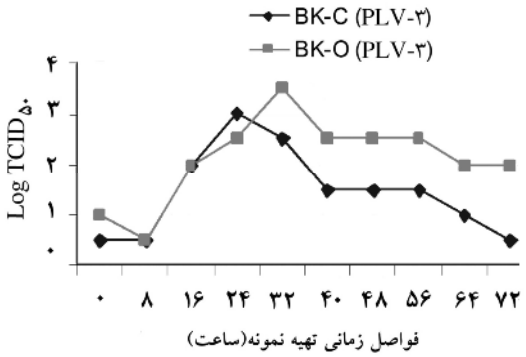
نمودار شماره ۱ مقایسه قدرت تکثیر و ارزیابی عیار ویروس‌های هرپس سیمپلکس تولیدشده در یاخته‌های BK-C و BK-O در فواصل زمانی ذکر شده (ساعت‌های مختلف بعد از تلقیح) را نشان می‌دهد (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه قدرت تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در یاخته‌های BK-O و BK-C. در ساعات اولیه تکثیر فقط ویروس‌های تلقیح شده موجود در محیط کشت قابل نشان دادن هستند، از ساعت ۱۶ به بعد که دوره محاق (eclipse period) تمام می‌شود ویروس‌های جدید وارد محیط می‌شوند. این روند تا تخریب کامل یاخته‌ها توسط ویروس‌ها ادامه دارد (ساعت سی‌ودوم تاشصت وچهار ساعت بعداز عفونت) و پس از آن نمودار سیر نزولی طی می‌کند.

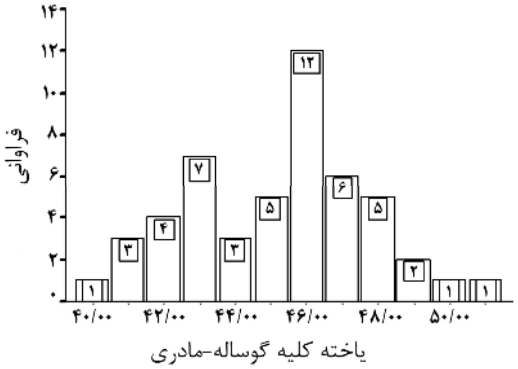
عیـار ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه قبل از تلقیح به سلول‌های هدف $TCID_{۵۰}$ ۱۰۷/۶ محاسبه شد و MOI برای ارزیابی قدرت تکثیر ویروس بر روی یاخته‌های BK-C و BK-O با در نظر داشتن ۱۰۶ یاختـه از هر رده در میلی‌لیتر برابر با ۴ محاسبه شـد.

عیار ویروس‌های پارا آنفولانزا تولید شده در یاخته‌های BK-C و BK-O در فواصل زمانی ذکر شده به ساعت در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است (نمودار ۲).

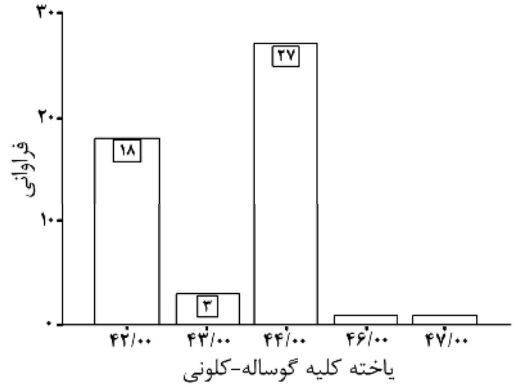


نمودار ۲: مقایسه قدرت تکثیر ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه در یاخته‌های BK-O و BK-C. همانطور که مشاهده می‌شود در ساعات اولیه تکثیر فقط ویروس‌های تلقیح شده موجود در محیط کشت قابل نشان دادن هستند، آنگاه از ساعت ۱۶ به بعد که دوره محاق (eclipse period) تمام می شود ویروس‌های جدید وارد محیط می شوند. این روند تا تخریب کامل یاخته‌ها توسط ویروس‌ها ادامه دارد (ساعت سی‌ودوم) که پس از آن نمودار سیر نزولی طی می‌کند.

کاریوتایپینگ: نمودارهای شماره ۳ و ۴ به ترتیب تعداد کروموزوم یاخته‌های BK را قبل از کلون‌سازی و بعد از کلون‌سازی در پاساژ سوم نشان می‌دهد (نمودارهای شماره ۳ و ۴)



نمودار ۳:کاریوتایپ یاخته‌های BK قبل از کلون سازی.



نمودار ۴: کاریوتایپ یاخته‌های BK در پاساژ سوم بعد از کلون سازی

همانطورکه مشاهده می‌شود سلول‌های کلون‌شده الگوی کاریوتایپی همگنتری نسبت به سلول‌های مادری نشان می‌دهند.

بحث

از ویژگی‌های رده‌های مداوم (نامیرا)، نداشتن ثبات ژنتیکی در آن‌ها است (۳ و ۱۸). این یاخته‌های به طور مداوم رشد و تکثیر می‌یابند و در نتیجه انواعی از یاخته‌های ناهمگن در کشت بوجود می‌آید. با توجه به این ناهمگونی لازم است تا یاخته‌های یکسانی از این رده‌ها تولید و برای مطالعه ویروس‌ها مورد استفاده قرار گیرد. این کار کلون‌سازی یاخته‌ها نامیده می‌شود.

در این تحقیق برای کلون کردن یاخته‌های BK لایه تغذیه‌کننده به کار گرفته شد. این لایه از یاخته‌های غیرفعال شده Vero تهیه شد که در شرایط طبیعی قادرند تا سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد سلولی از جمله PDGF[9]، β و TGFα[10] را تولید کند، که احتمالاً در اتصال و رشد کلون‌های جدید سلولی نقش مؤثر ایفا می‌نمایند (۲۲-۱۹).

در مورد یاخته BK، میانگین کاریوتاپ‌های تهیه شده در پاساژ مجهول (برای ۵۰ پلاک کروموزومی) ۴۵/۳ با انحراف معیار برابر با ۲/۶ بود که در نتیجه دامنه 2n برابر با ۴۰-۵۳ به دست‌آمد. کاریوتایپ پاساژ سوم یاخته‌های BK کلون شده انحراف معیار کوچکتری نسبت به رده یاخته‌ی مادری خود نشان می‌داد به‌طوری که میانگین آن ۴۳/۳ و انحراف معیار آن برابر با ۱/۱ (2n=۴۲-۴۷) بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود مقدار انحراف معیار پس از کلون‌سازی کمتر شده‌است، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با کاسته شدن از مقدار انحراف معیار پس از کلون‌سازی یکدستی بیشتری از لحاظ کاریولوژی در یاخته‌ها بوجود خواهد آمد.

مطالعه حاضر نشان داد که تکثیر ویروس در دو یاختهٔ مادری و کلون‌شده امکان پذیر بوده واختلاف معنی‌داری بین عیار حاصل از تکثیر ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک در این یاخته‌ها مشاهده نشد. در بررسی عیار ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه در این یاخته‌ها عیار ویروس تا ۴۰ ساعت روند افزاینده‌ای را نشان می‌دهد، اما از ساعت ۴۰ تا ۵۶ بعد از تلقیح عیار ویروس نسبتاً ثابت است. با توجه به نمودار ۲ این گونه استنباط می‌شود که در زمان صفر ویروس پاراآنفولانزا کمتری توانسته به سطح یاخته‌های BK-O

[9] Platelet-Derived Growth Factor
[10] Transforming growth factor alpha

اتصال یابد و این برخلاف آن چیزی است که در یاخته‌های BK-C رخ داده است. همچنین نشان می‌دهد که در یاخته‌های BK-O عیار بیشتری از ویروس نسبت به یاخته‌های BK-C به دست آمده است. اختلاف بین عیار ویروس‌های پاراآنفولانزا تیپ سه تولید شده در BK-C و BK-O بنابر آزمون تی معنادار بود. علی رغم اتصال ویروس به تعداد زیاد در یاخته‌های BK-C عیار ویروس پاراآنفولانزا تیپ سه در این رده کمتر از BK-O می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد سلول در طی کلون‌سازی صفاتی را از دست داده که منجر به افت عیار ویروس در سلول کلون‌شده گردیده است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر خدمتی از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی به لحاظ تأمین سلول BK تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

1. Freshney RI. Culture of Animal Cells. New York: Willey-Liss, 1994, 161-74.
2. Morgan SJ, Darling CD. Animal cell culture. London: Bios Scientific Publishers, 1993, 79-91.
3. Cann A. Virus Culture: A Practical Approach. New York: IRL-Press, 1999, 1-31.
4. Davis JM. Basic cell culture: A Practical Approach. New York: IRL-Press, 1994, 233-41.
5. Paul J. Cell and tissue culture. London: Churchil-Livingstone, 1975, 354-85.
6. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. vol 2. USA: ASM Press, 1990, 1-5.
7. Grigoreiv VG, Grigorieva T, Moerman EJ, et al. Senescent Fibroblast as Feeder cells for lymphoid cell cloning. Anal Biochem 1995; 236:250-4.
8. Butche RN, McCullough KC, Bryand J. Mitomycin C- Treated 3T3/B (3T3/A31) cell feeder layers in hybridoma technology. J Immunol Methods 1988; 107:245-51.
9. Coller HA, Coller BS. Poisson statical Analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. Methods Enzymol 1986; 121: 412-7.
10. Martin G, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of Teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies In Vitro. Proc Natl Acad Sci 1975; 72: 1441-5.
11. Sabatini LM, Allen-Hoffmann BL, Warner TF, et al. Serial cultivation of epithelial cells from human and macaque salivary glands. In Vitro Cell Dev Biol 1991;27A: 939-48.
12. Worten RG, Duff C. Karyotyping. Methods Enzymol 1979; 58: 322-8.
13. Saha SN. Studies on morphology karyology and growth pattern of PK-15 cell line. Indian Vet J 1987:447-51.
14. Saha SN, Rao BU. Comparative studies on two cell lines of IB-RS-2. Indian Vet J 1984; 61:817-20.
15. Saha SN, Sen AK. Studies selection of suitable cell system for adaptation, titration and plaque assay of Foot and Mouth Disease Virus Type A. Indian Vet J 1987; 64:541-5.
16. Schramayr S, Caporossi D, Mal I., et al. Chromosomal Damage Induced by Human Adenovirus type 12 requires expression of the E1B 55-Kilodalton Viral protein. J Virol 1990; 64:2090-5.
17. Specter S, Hodinka RL, Young SA. Clinical Virology Manual. Washington DC: ASM Press; 2000.
18. Bosque P, Prusiner S. Culture cell sublines highly susceptibles to prion infection. J Virol 2000; 74:4377-86.
19. Richmon Virginia, Coculture cells that express LIF enhance mouse blastocyst in vitro. J Assist Reprod Genet 1995; 12:153-6.
20. Aline P, Taupin J, Mayer G, et al. Human interleukin for DA cells of leukemia inhibitory factor is released by Vero cells in human embryo coculture. Fertil Steril 1991; 62:648-50.
21. Carngier JA, Morgan JJ, Mc Diarmid N, et al. Influence of protein supplements on the secretion of leukemia inhibitory mitomycin-pretreated vero cells: possible application to the in vitro production of bovine blastocyts with high cryotolerance. J Reprod Fertil 1999; 117: 41-8.
22. Jian-Loung H, Yu H, Yieh-loong T, et al. Cytokines and growth factors secreted by vero cells destined for embryo cocultures. Tzu Chi Med J 1998; 10:175-80.