بسم الله الرحمن الرحيم

MEGBI Training Course III

Vaccine production techniques: Egg based and Cell based amplification of influenza virus

1 day training course for researchers and technical staff

First EditionMay 2010

فنون لتصنيع اللقاح: العمل بتكبير فيروسات الانفلوينزا عن طريق البيض و عن طريق الخلايا

تدريب لمدة يوم واحد للباحثين و التقنيين

الاصدار الاول ايار 2010

Authors:

Noha Abdulwahab, Ghina al-Eter, Omran Zaki, Layal Chbib, and Mirna Khoder

Institute for Genetic Engineering, Ecology and Health (IGEEH)

Karlsruhe, Germany,

http://www.aecenar.com/institutes/igeeh

Postal Address: Verein für Gentechnik, Ökologie und Gesundheit (VGÖG) e.V., Haid-und-Neu-Str.7, 76131 Karlsruhe, Germany

مركز ابحاث الشرق الاوسط للجينات والتقنية البيولوجية

رأسنحاش – قضاء البترون - لبنان

Middle East Genetics and Biotechnology Institute (MEGBI)

Ras Nhache, Batroun, Lebanon,

www.aecenar.com/institutes/megbi

Email: info@aecenar.com

Remark: All photos in part II (Cell based virus propagation) are taken from laboratory work in MEGBI, Ras Nhache, Lebanon.

ملاحظة: جميع الصور المصورة بالكاميرا اخذت من العمل في مختبلار MEGBI في رأس نحاش - لبنان

Content / المضمون

I. EGG BASED INFLUENZA VIRUS PROPAGATION العمل بتكبير فيروسات الانفلوينزا عن طريق البيض 5

1 GENERAL REMARKS ON WORKING ON EGG BASED VIRUS PROPAGATION / ملاحظات عامة للعمل بتكبير الفيروس عن طريق البيض 6

1.1 BASIC LABORATORY SKILLS / المهارات المخبرية الأساسية 6
1.2 RECORDING DETAILS OF EGG PURCHASES / التسجيل بالتفصيل لعملية شراء البيض 7
1.3 CLEANING AND DECONTAMINATION / التنظيف و التطهير 7
1.4 INCUBATION OF EGGS BEFORE INOCULATION / حضانة البيض قبل التلقيح 9
1.5 INCUBATION OF EGGS AFTER INOCULATION / حضانة البيض بعد التلقيح 9
1.6 CLEANING AND DECONTAMINATION OF INCUBATORS / نظيف و تطهير الحاضنة 9
1.7 CANDLING EGGS / تشميع البيض 10
1.8 MARKING THE INOCULATION SITE / تعيين مكان التلقيح 11

2 PROTOCOL: INOCULATION OF EMBRYONATED EGGS WITH INFLUENZA VIRUS BY THE ALLANTOIC CAVITY ROUTE / تلقيح أنسجة البيض عن طري الالونتويك كافتي 13

2.1 INOCULATION OF THE ALLANTOIC CAVITY / تلقيح الالونتويك كافتي 14
2.2 HARVESTING ALLANTOIC FLUID TO TEST FOR PRESENCE OF HAEMAGGLUTININ / حصد الالونتويك كافتي لفحص وجود الهيماكلوتينين 16
2.3 HAEMAGGLUTINATION TEST / فحص الهيماكلوتينيشن 17
2.3.1 Red blood cell control in the haemagglutination test / تحكم الكريات الحمراء بفحص الهيماكلوتينيشن 18

II. CELL BASED VIRUS PROPAGATION العمل بتكبير فيروسات عن طريق الخلايا 19

3 INTRODUCTION: TISSUE CULTURE METHODS / طرق زراعة الأنسجة 20

3.1 TYPES OF CELLS GROWN IN CULTURE/ أنواع الخلايا التي تتكاثر خلال الزراعة 20
3.1.1 Primary cell cultures / زرع الخلايا البدائية أو الأولية 20
3.1.2 Diploid cell strains / سلالات الخلايا المضاعفة 21
3.1.3 Continuous cell lines / خطوط الخلايا المستمرة بالتطور 21
3.2 WORKING AREA AND EQUIPMENT / مكان العمل و المعدات 22
3.2.1 CO_2 Incubators / معدل ثاني أوكسيد الكربون في الحاضنة 22
3.2.2 Microscopes / المجهر 22
3.2.3 Vessels / الأوعية 22
3.3 PRESERVATION AND STORAGE OF TISSUE CELLS / الحفظ و التخزين 23
3.4 HARVESTING AND REFEEDING CULTURE CELLS / الحصاد 24
3.4.1 Suspension culture / زراعت الخلايا الغير ملتصقة 24

3.4.2 Adherent cultures / زراعت الخلايا الملتصقة *24*
3.5 MEDIA AND GROWTH REQUIREMENTS / متطلبات الوسط الغذائي والنمو 26
3.5.1 Physiological parameters / المقاييس الفزيولوجية *26*
3.5.2 Medium requirements (often empirical) / متطلبات الوسط الغذائي (غالباً تجريبي) *27*
3.5.3 Feeding / التغذية *27*
3.5.4 Measurement of growth and viability / مقياس النمو و القدرة على العيش *28*
3.6 SAFETY CONSIDERATIONS / إرشادات السلامة 28
3.7 TISSUE CULTURE PROCEDURES / إجراءات زراعة الأنسجة 29
3.7.1 Subculturing adherent cells / الزراعة الفرعية للخلايا الملتصقة *30*
3.7.2 Trypsin-EDTA / EDTA - التريبسين *30*
3.7.3 EDTA alone / EDTA وحده *31*
3.7.4 Thawing frozen cells / تذويب الخلايا المجمدة *32*
3.7.5 Freezing cells / تجميد الخلايا *32*
3.7.6 Viable cell counts with Hemacytometer / حساب الخلايا الحية *32*

4 PROTOCOL: CULTURE OF PRIMARY CHICKEN EMBRYO FIBROBLAST (CEF) CELLS / برتوكول: الزراعة الأولية لخلايا جنين بيضة الدجاج 35

4.1 MATERIALS / المواد 35
4.1.1 Preparation of Saline A / صناعة سالين أ *36*
4.1.2 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) / صناعة أم اي أم *36*
4.2 DEVICES / الاجهزة 38
4.3 PROTOCOL 39

I. Egg Based Influenza Virus Propagation
العمل بتكبير فيروسات الانفلوينزا عن طريق البيض

1 General remarks on working on egg based virus propagation /ملاحظات عامة للعمل بتكبير الفيروس عن طريق البيض

Chickens are susceptible to many infectious diseases. One of the most important of these is the viral disease known as influenza which is caused for examples by the actural H1N1 virus. For this reasons viruses can be propagated will in chicken eggs for vaccine production purpose.

الدجاج معرض إلى العديد من الأمراض المعدية.أحد أهم هذه الامراض المعروفة هو مرض الإنفلونزا الذي يسبب ب فيروس H1N1.. . لهذا السبب يمكننا تكبير الفيروس في البيض لإنتاج اللقاح المفترض.

Eggs for our work can be purchase from normal chicken farms.the eggs must be 9-10 days old when purchased.

يمكننا شراء البيض الملقح والمناسب لعملنا من مزرعة الدجاج و يجب أن يتراوح عمره من 9-10 أيام.

Then the virus probe is inoculated into the eggs where the virus is propagated while the eggs are incubated. The work must be done under very clean circumstances and atmosphere to prevent contamination.

الفيروس المراد تكبيره يوضع في البيض ثم نضع البيض في الحاضنة. يجب المحافظة على مكان العمل لمنع التلوث.

Testing the actual state of the eggs is done by candling.

1.1 Basic laboratory skills / *المهارات المخبرية الأساسية*

Laboratory staff should be familiar with and have practiced the following skills prior to the commencement of H1N1 disease vaccine production - this manual does not contain further details about these skills:

موظفو المختبر يجب أن يكونوا يداً واحدة ضمن ممارستهم المهارات التالية قبل البدء بإنتاج اللقاح لمرض ها1ن1

- Aseptic technique.
- تقنية التعقيم
- Sterilization by autoclaving and hot air of glassware and discarded materials.
- التعقيم بواسطة الهواء الحار للزجاجيات و التخلص من فضلات المواد .

1.2 Recording details of egg purchases / *التسجيل بالتفصيل لعملية شراء البيض*

An order can be placed for the delivery of the eggs. It is useful if the person responsible for placing the orders and receiving the eggs keeps records. The following information should be recorded in a notebook set aside for this purpose.

- Date when the eggs are ordered and the name of the person who
- received the order.
- Number and age of the eggs ordered.
- Date and number of the eggs received.
- Colour and appearance of the eggs received.
- Number of eggs damaged during transport.
- Date and number of eggs placed in incubator.
- Number of viable eggs after candling prior to inoculation.

يمكن وضع نظام لتقديم البيض .ومن المفيد إذا الشخص المسؤول عن وضع الأوامر وتلقي البيض يحفظ المعلومات بسجلات. ينبغي تسجيل المعلومات التالية في دفتر خاص:

- تاريخ متى تم طلب البيض واسم الشخص الذي تلقى الطلب.
- عدد وعمر البيض المطلوب.
- تاريخ وعدد البيض المستلم.
- لون ومظهر البيض المستلم .
- عدد البيض المنكسر خلال النقل .
- تاريخ وعدد البيض الموضوع بالحاضنة
- عدد البيض المتوفر بعد التشميع و المفضل للتلقيح

1.3 Cleaning and decontamination / *التنظيف و التطهير*

Appropriate chemical disinfectants must be used for cleaning equipment, materials and work surfaces. All laboratory wastes must be assigned to a category and placed in clearly labeled

يجب إستخدام المطهرات الكيميائية الملائمة لمعدات التنظيف ,الأدوات وأسطح العمل. جميع نفايات المختبر يجب أن توضع حسب فئتها في صناديق مع

تفسير واضح إلى أن نتخلص منها بشكل مناسب .

الكحول

70 في المئة من الكحول المخففة بالماء هي مفيدة لمسح المقاعد وتطهير السطح الخارجي للبيض قبل التلقيح و حصد سائل الألونتوييك . إلاّ أن زيادة 2 في المئة من الإيودين تيزيد من فعالية المحلول .

ملاحظة: 70 في المئة من الكحول قادرة على الإشتعال !

الكلورين

يوجد عدة مركبات للكلور التي يمكن استخدامها كمطهرات :هيبوكلوريت الصوديوم أو المواد المبيضة المتوفرة في المنازل والرخيصة. نقع 2 في المئة من الكلور خلال الليل مفيد لتطهير المواد البلاستيكية.

ملاحظة عندما بدأت صناعة المواد المبيضة كانت تحتوي من 12 إلى 14 في المئة من الهيبوكلوريت إلاّ أن هذه النسبة تنقص مع الوقت.

ملاحظة الكلور يدمر و يأكل المعادن !

لذلك إقرأ دائماً الإرشادات قبل إستعمال مواد التنظيف أو التطهير !

bins from where the waste will be disposed of appropriately.

Alcohol

A 70% volume/volume (v/v) solution of alcohol diluted with water is useful for wiping down benches and disinfecting the outside of eggs before inoculation and harvesting of allantoic fluid. The addition of 2 percent iodine will increase the effectiveness of this solution.

Note that 70 percent solution of alcohol is flammable!

Chlorine

There are several chlorine compounds that are used as disinfectants. Sodium hypochlorite (NaOCl) or household bleach is readily available and cheap.

Soaking overnight in a 2 percent solution of chlorine is useful for disinfecting plastic materials. Note that commercial bleach contains 12 to 14 percent hypochlorite when manufactured but this concentration deteriorates with time.

Note that chlorine damages fabric and corrodes many metals!

Always read the instructions before using disinfectants and cleaning reagents!

1.4 Incubation of eggs before inoculation / *حضانة البيض قبل التلقيح*

Many vaccine production centres will already have large commercial incubators installed. Smaller incubators are available and are suitable for the small-scale production of vaccine.

العديد من مراكز إنتاج اللقاح لديها حاضنات تجارية مثبتة .أصغر الحاضنات المتوفرة مناسبة لإنتاج اللقاح على نطاق صغير .

- Incubation temperature = 38oC to 39oC.
- Humidity should be maintained at 60 to 65 percent. A tray filled with water and placed in the bottom of the incubator is usually sufficient to maintain this level of humidity.
- Place the eggs in the incubator with the air sac on top.

- درجة حرارة الحضانة من 38 إلى39 درجة مئوية.
- ينبغي الحفاظ على الرطوبة من 60 إلى 65 بالمئة. بواسطة صينية مليئة بالماء توضع في الجزء السفلي من الحاضنة وعادة تكفي للحفاظ على هذا المستوى من الرطوبة.
- ضع البيض في الحاضنة بطريقة أن يكون الكيس الهوائي للبيضة من جهة الأعلى.

1.5 Incubation of eggs after inoculation / *حضانة البيض بعد التلقيح*

Inoculated eggs contain virus and should be placed in a different incubator.

البيض الملقح يحتوي على الفيروس ويجب وضعه في حاضنة أخرى.

1.6 Cleaning and decontamination of incubators / *نظيف و تطهير الحاضنة*

Keep surfaces clean by wiping out with a wet cloth and disinfecting with 70 percent alcohol solution or a non-corrosive disinfectant.

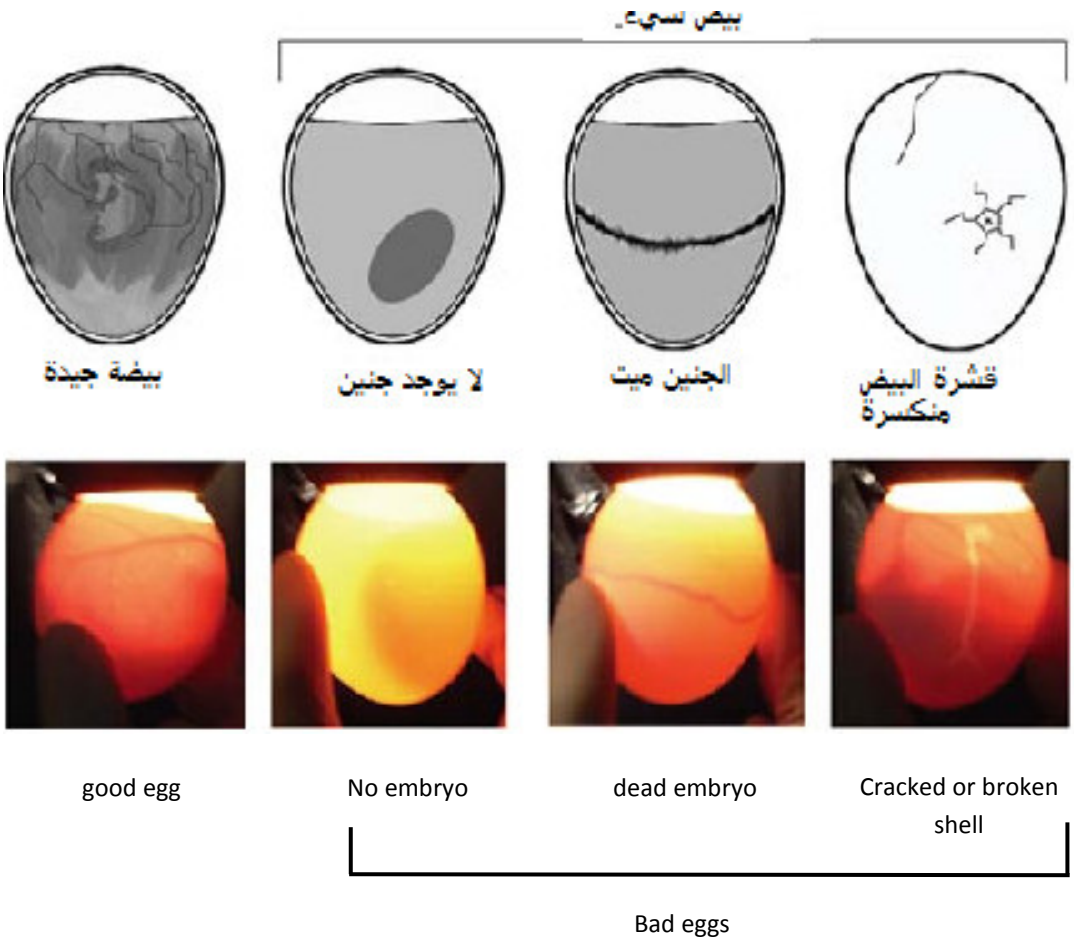
حفاظ على أسطح الحاضنة نظيفة عن طريق المسح بقطعة قماش مبللة وتطهيرها ب 70 في المئة من محلول الكحول

أو أي مطهر آخر غير قابل للتآكل.

1.7 Candling eggs / *تشميع البيض*

التشميع هو عملية عقد ضوء قوي من أعلى أو أسفل البيضة بهدف مراقبة الجنين. مصباح التشميع يتألف من مصباح كهربائي قوي مغطى بالبلاستيك أو حاوية من الألومنيوم الذي يحتوي على مقبض وفتحة. يتم وضع البيض مقابل هذه الفتحة ويتم إضاءتها بالنور. إذا لم يكن لديك مصباح تشميع. حاول استخدام الشمعة. يتم التشميع في غرفة مظلمة أو من خلف الستائر.

Candling is the process of holding a strong light above or below the egg to observe the embryo. A candling lamp consists of a strong electric bulb covered by a plastic or aluminium container that has a handle and an aperture. The egg is placed against this aperture and illuminated by the light. If you do not have a candling lamp, improvise. Try using a torch. Candling is done in a darkened room or in an area shielded by curtains.



1.8 Marking the inoculation site / *تعيين مكان التلقيح*

1. Hold the blunt end of the egg against the aperture of the candling lamp and note the position of the head of the embryo.
2. Turn the egg a quarter turn away from the head.
3. Draw a line on the shell marking the edge of the air sac.
4. Draw an X approximately 2 mm above this line.

1. ضع يدك عند النهاية الحادة للبيضة مقابل فتحة المصباح ثم لاحظ موقع رأس الجنين.
2. ادر البيضة ربع دوره بعيدا عن الرأس.
3. ارسم خطا على قشرة البيضة لتعليم مساحة الكيس الهوائي.

4. ضع إشارة على حوالي 2 مم فوق هذا الخط.

5. مكان هذه الإشارة يكون موقع التلقيح.

ملاحظة: بعض البيض لديهم كيس هوائي غير مكتمل في مكانه ولكن من نصف البيضة إلى أسفلها. وهو غير مناسبا لإنتاج اللقاح.

5. The X marks the inoculation site.

Note: In some eggs the air sac will have not developed on the blunt end but half way down the egg. These eggs are not suitable for vaccine production.

2 Protocol: Inoculation of embryonated eggs with influenza virus by the allantoic cavity route[1] / تلقيح أنسجة البيض عن طري الالونتويك كافتي

The most convenient method of propagating of influenza virus in the laboratory is by the inoculation of the allantoic cavity of embryonated eggs. All strains of virus will grow in the cell of the allantoic cavity. The virus enters these cells where it multiplies. As the cells are disrupted the virus is shed into the allantoic fluid. Virulent strains of the virus will invade cells beyond the lining of the allantoic cavity and kill the embryo. The time taken for this to occur is the basis of the “Mean Death Time Assays”, which indicates the level of virulence. The avirulent strain of influenza virus will not kill embryos inoculated into the allantoic cavity.

Inoculation of the allantoic cavity of embryonated eggs is a technique used in the following procedures:

1. influenza virus vaccine production

2. Establishing the infectivity titre of a suspension of virus.

3. Isolation of virus from field specimens for laboratory Diagnosis

الطريقة الأكثر ملاءمة لنشر فيروس الإنفلونزا في المختبر هي التلقيح عن طريق الالونتويك كافتي لخلايا البيض.لأن جميع سلالات الفيروس تنمو داخل هذه الخلايا. عندما يدخل الفيروس هذه الخلايا تتوقف عن التكاثر.فيقع الفيروس في سائل الالونتويك كافتي والسلالات الفيروس القاتلة تغزو الخلايا خارج بطانة الالونتويك كافتي وتقتل الجنين. الوقت المستغرق لهذا الحدث هو أساس ما يسمى "يعني الموت وقت فحوصات" ، مما يدل على مستوى من العنف والحدة.أمّا السلالات الغير قاتلة من فيروس الانفلونزا لا تقتل الجنين الملقح في الالونتويك كافتي.التقنية المستخدمة لتلقيح البيض هي عن طريق الالونتويك كافتي ضمن الإجراءات التالية:

1. إنتاج لقاح فيروس الإنفلونزا .
2. إنشاء كمية من عدوى الفيروس المتوقف عن العمل
3. عزل الفيروس من العينات الميدانية للمختبرات التشخيصية

[1] Taken from Food and Agriculture Organization of the United Nations (www.fao.org) document ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/005/ac802e/ac802e01.pdf.

2.1 Inoculation of the allantoic cavity / *تلقيح الالونتويك كافتي*

Materials

Eggs 9-day old or 10-day old embryonated eggs. Candle the eggs and mark the inoculation sites . Eggs should be placed in an egg rack with the inoculation site uppermost.

- Egg shell punch or forceps.
- Cotton.
- A 70 % alcohol solution in water.
- Syringe 1 mL.
- Needles preferably 25 gauge, 16 mm.
- sticky tape or melted wax to seal the inoculation site.
- Inoculum. This must be free of microbial contamination.
- Discard tray.

Method

1. Use cotton wool and 70 percent alcohol to swab the end of the eggs to be inoculated. Allow the alcohol to evaporate.

2. Swab the eggshell punch with 70 percent alcohol solution. Place used cotton wool in discard tray.

المواد

بيض ملقح من عمر 9 إلى 10 أيام . تشميع البيض وتعليم مواقع التلقيح. يجب وضع البيض في رفوف البيض بعد التلقيح من الجهة العليا.

- مخرمة لتقشر البيض أو ملقط.
- قطن.
- محلول الكحول 70 في المئة في الماء.
- حقنة 1 مل.
- حقن يفضل مقياسها 25 أو 16 ملم.
- شريط لاصق أو شمع ذائب لإغلاق موقع التلقيح.
- اللقاح ويجب أن يكون خالي من التلوث الميكروبي.
- طبق أو صينية لرمي النفايات.

الطريقة

1. استخدم القطن و محلول الكحول لمسح مكان الكيس الهوائي للبيض مكان تعيين التلقيح.ثم إسمح لمحلول الكحول أن يتبخر.

2. إمسح مكان ثقب قشرة البيضة في 70 في المئة من محلول الكحول ضمن الصينية المعدة للنفايات مع القطن.

3. Pierce a hole in the end of the egg at the marked inoculation site.

4. Attach needle to 1 mL syringe.

5. Draw inoculum into 1 mL syringe.

6. Keeping the needle and syringe vertical, place the needle through the hole in the eggshell. The needle will need to penetrate approximately 16mm into the egg to reach the allantoic cavity.

7. Inject 0.1 mL of inoculum into the egg.

8. Withdraw the needle from the egg.

9. Seal the hole in the shell with stationery tape or melted wax.

10. Discard the used needles and syringes.

11. Place the inoculated eggs into a second incubator. Check the temperature and humidity of incubator.

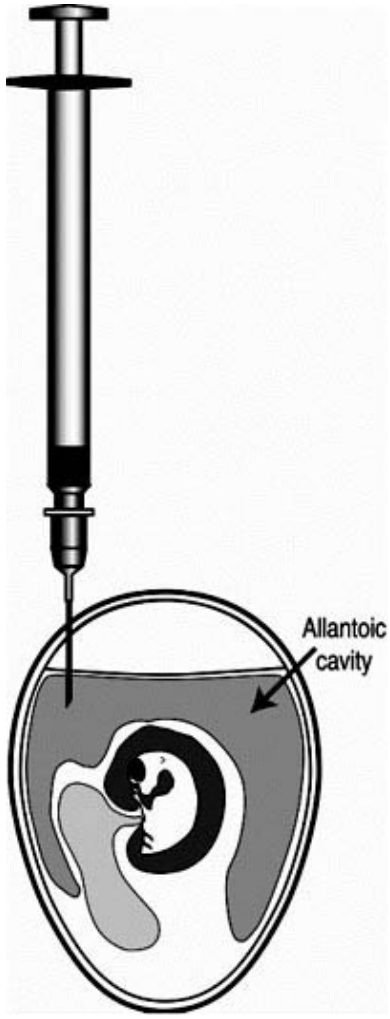


Figure 2: Inoculation of the allantoic cavity

صورة 2: تلقيح عبر الألونتويك كافتي

3. أثقب قشرة البيضة في المكان المعين للتلقيح .

4.جهز الحقنة على 1 مل.

5. أدخل اللقاح في الحقنة إلى 1 مل.

6. حافظ على الإبرة عاموديا ,ضع الإبرة من خلال الثقب في قشرة البيضة. الإبرة بحاجة أن تدخل لحوالي 16مم في البيضة لتصل إلى الالونتويك كافتي.

7. حقن البيضة ب 0.1 مل من اللقاح.

8. إسحب الإبرة من البيضة .

9.أغلق ثقب القشرة بالمادة اللاصقة .

10.إرمي الحقن و الإبر المستعملة .

11.ضع البيضة الملقحة في حاضنة أخرى. تحقق من

حرارة و رطوبة الحاضنة.

2.2 Harvesting allantoic fluid to test for presence of Haemagglutinin / *حصد الالونتويك كافتي لفحص وجود الهيماكلوتينين*

The following method describes harvesting a small sample of allantoic fluid for testing for the presence of haemagglutinin using the rapid or micro tests.

الطريقة التالية تصف كيفية حصد كمية صغيرة من سائل الالونتويك لفحص وجود الهيماكلوتينين (ها1). عبر فحص سريع .

Materials

المواد

• Forceps or a small pair of scissors

– ملقط أو مقص صغير .

• Absolute alcohol for flaming forceps

– كحول لتعقيم الملقط.

• Cotton.

– قطن .

• 70 percent alcohol solution

– 70 في المئة من محلول الكحول.

• Discard tray

– صينية لرمي النفايات.

• 50 µL micropipette and tips, a wire loop or sterile Pasteur pipettes

– ممصة 50 ميكرو ليتر مع تيبس (tips) , مع قطارة.

Method

الطريقة

1. Chill eggs at 4oC for at least two hours to kill the embryo and to reduce the contamination of the allantoic fluid with blood during harvesting.

1.برّد البيض على 4 درجة مئوية لمدة ساعتين لقتل الجنين و لتقليل تلوث سائل الالونتويك بالدم أثناء الحصد .

2. Remove sticky tape (if used to seal the eggs) and swab each egg with cotton wool soaked with 70 percent alcohol to disinfect and remove

2.إنتزع المادة اللاصقة(التي تم استعمالها سابقا) و امسح

condensation from the shells.

3. Dip the forceps or scissors in absolute alcohol and flame to sterilize. Remove the eggshell above the air space.

4. Discard embryos that are visibly contaminated.

5. Remove a sample of allantoic fluid from each egg. Use a micropipette and sterile tip, sterile glass pipette or a flamed loop and dispense the sample according to method being used for the test

كل بيضة بالقطن المبلل ب 70 في المئة من الكحول لتطهير و إزالة كثافة القشرة.

3.أغمس الملقط أو المقص في الكحول ثم فوق النار للتعقيم.

4.إنتزع قشرة البيضة فوق منطقة الهواء .

5.إرمي الأجنة لأنها بالتأكيد ملوثة.

6.إنتزع سائل الالونتويك من كل بيضة . بإستعمال ماصة ميكرو(micropipette) و تيب (tip) معقم.

2.3 Haemagglutination test / *فحص الهيماكلوتينيشن*

This is the result of the haemagglutinin part of the haemagglutinin/ neuraminidase viral protein binding to receptors on the membrane of red blood cells. The linking together of the red blood cells by the viral particles results in clumping. This clumping is known as haemagglutination. Haem-agglutination is visible macroscopically and is the basis of haemagglutination tests to detect the presence of viral particles. The test does not discriminate between viral particles that are infectious and particles that are degraded and no longer able to infect cells. Both can cause the agglutination of red blood cells.

هذه هي نتيجة جزء هيماكلوتينين من الهيماكلوتينين /النورامينيداز باتصاله مع المستقبل (receptor) على غشاء الكريات الحمراء .هذا الاتصال هو نتيجة دموية .هذه النتيجة الدموية (التجمد) تسمى ب الهيماكلوتينيشن. الهيماكلوتينيشن يرى نظريا و هو أساس فحص الهيماكلوتينيشن لتحديد وجود الفيروس . هذا الفحص لا يميز بين الفيروسات المكتملة والفيروسات المدمرة والغير قادرة على إصابة الخلايا. الأن الاثنين يسببان ب الهيماكلوتيتيشن مع الكريات الحمراء .

2.3.1 Red blood cell control in the haemagglutination test /

تحكم الكريات الحمراء بفحص الهيماكلوتينيشن

Every time a haemagglutination test is carried out, it is necessary to test the settling pattern of the suspension of red blood cells. This involves mixing diluent with red blood cells and allowing the cells to settle.

1. Dispense diluent.

2. Add red blood cells and mix by gently shaking.

3. Allow the red blood cells to settle and observe the pattern.

4. Observe if the cells have a normal settling pattern and there is no auto-agglutination. This will be a distinct button of cells in the micro test and an even suspension with no signs of clumping in the rapid test.

Note: The diluent used for haemagglutination tests in this manual is PBS. There should be no signs of haemolysis in the red blood cell suspension. If there are signs of haemolysis, a fresh suspension must be prepared. There should not be any sign of auto-agglutination in the red blood cell control. If an agglutination pattern is observed, discard the suspension of red blood cells. Prepare a fresh suspension and test again.

في كل مرة يتم إجراء فحص الهيماكلوتينيشن , الضروري لفحص العينة المترسخة من تعليق كريات الدم الحمراء . وتتم هذه العملية بخلط مخفف من السائل مع كريات الدم الحمراء ثم السماح للخلايا أن تترسخ.

1. إستغني عن التخفيف .

2. اضف الكريات الدم الحمراء و اخلط بنعومة .

3. إسمح لكريات الدم الحمراء بالترسخ وأنظر إلى العينة

4. انظر إذا كانت الخلايا تملك ترسخ في العينة طبيعيا وأنه غير مجمد نفسه وهذا سيميز برعم الخلايا في الفحص الدقيق وحتى في التعليق من دون أي إشارة للتجمد في الفحص السريع.

ملاحظة: السائل المخفف المستعمل في فحص الهيماكلوتينيشن هو ال بي بي أس (PBS). يجب أن لا يكون هناك أي إشارة لإنحلال كريات الدم الحمراء المعلقة . أمّا إذا كانت توجد هذه الإشارة ,يجب تحضير معلق آخر. يجب أن لا يكون هناك أي إشارة للتجمد الذاتي لكريات الدم الحمراء .أمّا إذا كان هذا التجمد واضحا , فيجب رمي التعليق من كريات الدم الحمراء . و تحضير تعليق آخر لفحص آخر.

II. Cell Based Virus Propagation
العمل بتكبير فيروسات عن طريق الخلايا

العمل بتكبير فيروسات عن طريق الخلايا

3 Introduction: Tissue Culture Methods / طرق زراعة الأنسجة

3.1 Types of cells grown in culture / *أنواع الخلايا التي تتكاثر خلال الزراعة*

Tissue culture is often a generic term that refers to both organ culture and cell culture and the terms are often used interchangeably. Cell cultures are derived from either primary tissue explants or cell suspensions. Primary cell cultures typically will have a finite life span in culture whereas continuous cell lines are, by definition, abnormal and are often transformed cell lines.

زرع الأنسجة: يعود هذا المصطلح لزرع الخلايا و زرع الأعضاء وغالباً ما يستخدم بالتبادل بينهما.زرع الخلايا يأتي إمّا من حصد الأنسجة البدائية أو من الخلايا المعلقة. زرع الخلايا البدائية عادةً تعيش لفترة قصيرة بينما خطوط الخلايا المستمر بالتطور هو غير طبيعي و غالباً ما سيتحول.

3.1.1 Primary cell cultures / زرع الخلايا البدائية أو *الأولية*

When cells are taken freshly from animal tissue and placed in culture, the cultures consist of a wide variety of cell types, most of which are capable of very limited growth in vitro, usually fewer than ten divisions. These cells retain their diploid karyotype, i.e., they have the chromosome number and morphology of their tissues of origin. They also retain some of the differentiated characteristics that they possessed in vivo. Because of this, these cells support the replication of a wide range of viruses. Primary cultures derived from monkey kidneys, mouse fetuses, and chick embryos are commonly used for diagnostic purposes and

عندما نؤخذ الخلايا طازجة من انسجة الحيوان و توضع للزراعة ,تكون هذه الخلايا محتوية على عدد كبير من عدّة أنواع من الخلايا و معظم الذين يقدرون على العيش خارج الجسم(في المختبر) لا يستطيعون أن ينقسموا إلى أكثر من 10 إنقسامات. هذه الخلايا تحتفظ بنواة الخلية (karyotype) مثل :الإحتفاظ بعدد الصبغيات أو الكروموزومات (chromosomes) و شكلها كخلاياها الأصلية تماماً.كما تحتفظ ببعض خصائصها الإنقسامية (differenciated) كما كانت داخل الجسم.لهذا السبب , تكون هذه الخلايا محطة تكاثر للعديد من الفيروسات. عادةً الخلايا البدائية المستخرجة من كلى القرد , جنين الفأر ,و جنين الدجاجة تستخدم لدوافع

laboratory experiments.

تشخيصية و تجارب مخبرية.

3.1.2 Diploid cell strains / سلالات الخلايا المضاعفة

Some primary cells can be passed through secondary and several subsequent subcultures while retaining their original morphological characteristics and karyotype. Subcultures will have fewer cell types than primary cultures. After 20 to 50 passages in vitro, these diploid cell strains usually undergo a crisis in which their growth rate slows and they eventually die out. Diploid strains of fibroblasts derived from human fetal tissue are widely used in diagnostic virology and vaccine production.

بعض الخلايا الأولية تستتطيع أن تنتقل إلى المرحلة الثانية أو ألى عدة مراحل أخرى من الزراعة الثانوية مع الإحتفاظ بخصائصها الأصلية كالشكل و نواة الخلية (karyotype). الزراعة الثانوية ستملك الآن عدد أقل من الخلايا عمّا كان في المرحلة الأولى. بعد 20إلى 30 مرحلة في المختبر , عادةً سلالات هذه الخلايا المضاعفة تمر في أزمة تؤدي في إبطاء نموها ثم في النهاية إلى موتها. سلالات fibroblast المضاعفة و المستخرجة من أنسجة جنين الإنسان تستعمل في التشخيص الفيرولوجي و في إنتاج اللقاح بشكل واسع.

3.1.3 Continuous cell lines / خطوط الخلايا المستمرة بالتطور

Certain cultured cells, notably mouse fetal fibroblasts, kidney cells from various mammalian species, and human carcinoma cells, are able to survive the growth crisis and undergo indefinite propagation in vitro. After several passages, the growth rate of the culture slows down; then isolated colonies of cells begin to grow more rapidly than diploid cells, their karyotype becomes abnormal , their morphology changes, and other poorly understood changes take place that make the cells immortal. The cells are now "dedifferentiated," having lost the specialized morphology and

بعض الخلايا المزروعة لا سيما خلايا الليمفية(fibroblast) لجنين الفأر ,خلايا الكلى من عدة أنواع من الثديات , و خلايا الإنسان السرطانية , قادرة على العيش رغم الأزمات المتكررة التي تتعرض لها في المختبر. بعد عدة مراحل, نسبة نمو الزرع ستنخفض , أما مجموعات الخلايا المعزولة ستبدأ بالنمو بسرعة أكبر من الخلايا المضاعفة, ونواة الخلايا ستصبح غير طبيعية , شكلها سيتغير, و تغيرات أخرى غير مفهومة ستحدث لتجعل الخلايا حية لمدى طويل. الخلايا الآن أصبحت غير قادرة على الإنقسام (dedifferenciated), بعد أن

biochemical abilities they possessed as differentiated cells in vivo. Continuous cell lines and HeLa, both derived from human carcinomas, support the growth of a number of viruses.

خسرت شكلها الخاص و قدرتها الكيميائية الحيوية. خطوط الخلايا المستمرة و خلايا هيلا (HeLa) , المأخوذان من خلايا إنسانية السرطانية ,و التي تساعد على نمو عدد كبير من الفيروس.

3.2 Working area and equipment / *مكان العمل و المعدات*

3.2.1 CO_2 Incubators / معدل ثاني أوكسيد الكربون في الحاضنة

The cells are grown in an atmosphere of 5-10% CO_2 because the medium used is buffered with sodium bicarbonate/carbonic acid and the pH must be strictly maintained. Culture flasks should have loosened caps to allow for sufficient gas exchange. Cells should be left out of the incubator for as little time as possible and the incubator doors should not be opened for very long. The humidity must also be maintained for those cells growing in tissue culture dishes so a pan of water is kept filled at all times.

تنمو الخلايا في فضاء يحتوي من 5-10% من ثاني أوكسيد الكربون لأن الوسط المغذي يحتوي على عازل يتضمن بيكاربونات الصوديوم \أسيد الكاربونيك و يجب أن تكون درجة الحموضة ثابتة بدقة. لا يجب أن يكون غطاء قوارير الزراعة محكماً ليسمح بتغير الهواء. يسمح للخلايا أن تخرج من الحاضنة لوقت قصير جداً و كذلك باب الحاضنة يمكن فتحه لفترة قصيرة. كما يجب المحافظة على معدل نسبة الرطوبة في الحاضنة من خلال المحافظة على وجود وعاء ماء دائماً فيها لضمان نمو الخلايا.

3.2.2 Microscopes / المجهر

Inverted phase contrast microscopes are used for visualizing the cells. Before using the microscope, check that the phase rings are aligned.

الطبقة المعاكسة للمجهر هي التي تستخدم لمشاهدة الخلايا. تأكد من محاذات الطبقة الدائرية للمجهر قبل الإستعمال.

3.2.3 Vessels / الأوعية

The vessels should be transparent surface that will allow cells to attach

يجب أن تكون الأوعية ذو سطح شفاف ليسمح الخلايا

and allow movement for growth. The most convenient vessels are specially-treated polystyrene plastic that are supplied sterile and are disposable. These include petri dishes, multi-well plates, microtiter plates, roller bottles, and screwcap flasks .

أن تتجمع و تتحرك لنمو. و من الأوعية الأكثر ملاءمةً تلك المصنوعة من بلاستيك البوليستيرين و التي يمكن أن نجده معقماً ثم نقدر على رميه بسهولة. تتضمن هذه الأوعية : علبة بتري, multi-well plates, microtiter plates, roller bottles, and screwcap flasks

3.3 Preservation and storage of tissue cells / *الحفظ و التخزين*

(If available) liquid N_2 is used to preserve tissue culture cells, either in the liquid phase (-196°C) or in the vapor phase (-156°C). Freezing can be lethal to cells due to the effects of damage by ice crystals, alterations in the concentration of electrolytes, dehydration, and changes in pH. To minimize the effects of freezing, several precautions are taken. First, a cryoprotective agent which lowers the freezing point, such as glycerol or DMSO, is added. A typical freezing medium is 90% serum, 10% DMSO. In addition, it is best to use healthy cells that are growing in log phase and to replace the medium 24 hours before freezing. Also, the cells are slowly cooled from room temperature to -80°C to allow the water to move out of the cells before it freezes. The optimal rate of cooling is 1°-3°C per minute.

The Mr. Frosty is filled with 200 ml of isopropanol at room temperature and the freezing vials containing the cells are placed in the container and the container is placed in the -80°C freezer. The effect of the isopropanol is to

(اذا موجود) يستعمل سائل النيتروجين لحفظ أنسجة الخلايا المزروعة , إما أن يكون سائلاً (196°c-)أو غازياً (156°c-). هذه المرحلة يمكن أن تقتل الخلايا بسبب قطع الثلج الموجودة, أو عبر تعديل تركيز الإلكتروليت , الجفاف ,أو من درجة الحموضة المتغيرة. لتقليل هذه المؤثرات الثلجية , إجراءات عديدة يمكن أخذها : أولاً , من عوامل الحماية التي تقلل من درجة التجمد , زيادة الكليسرول أو DMSO. وسط التجميد المغذي النموذجي يحتوي على 90% من المصل ,10% من DMSO . بالإضافة إلى ذلك , فمن الأفضل إستعمال خلايا سليمة و التي تقدر على النمو لفترة طويلة مع إستبدال الوسط المغذي قبل 24 ساعة من التجميد. أيضاً عملية تجميد الخلايا تتم ببطء من درجة حرارة الغرفة إلى 80°c- للسماح للماء بالخروج من داخل الخلايا. أفضل نسبة للتبريد هي من 1 إلى - 3°c في الدقيقة .

السيد فروستي () أضاف 200 مل من الإيزوبروبانول على درجة حرارة الغرفة إلى قارورة الخلايا التي ستتجمد

allow the tubes to come to the temperature of the freezer slowly, at about 1°C per minute.

على $80°c$–.دور الإيزوبروبانول هو تبطيء سرعة التجمد إلى$1°c$ بالدقيقة.

MAINTENANCE

المتابعة

Cultures should be examined daily, observing the morphology, the color of the medium and the density of the cells. A tissue culture log should be maintained that is separate from your regular laboratory notebook. The log should contain: the name of the cell line, the medium components and any alterations to the standard medium, the dates on which the cells were split and/or fed, a calculation of the doubling time of the culture (this should be done at least once during the semester), etc.

يجب أن تفحص الخلايا المزروعة يومياً, لمراقبة شكلها ,لون الوسط المغذي و كثافة الخلايا. لذلك يجب أن يكون هناك سجل خاص في المختبر يدوّن عليه جميع تغيرات الخلايا المزروعة. يحتوي هذا السجل على : إسم خطوط الخلايا, محتويات الوسط المغذي و أي تعديل تم فيه, تاريخ متى تم فصل الخلايا و\أو تغذيتها, حساب الوقت المضاعف للزرع (و هذا يجب أن يفعل مرة واحد في الفصل على الأقل) , و ما إلى ذلك.

3.4 Harvesting and refeeding culture cells / الحصاد/

Cells are harvested when the cells have reached a high density which suppresses growth.

يتم حصد الخلايا عندما تصل إلى مرحلة الكثافة العالية التي تقمع النمو .

3.4.1 Suspension culture / زراعت الخلايا الغير ملتصقة

Suspension cultures are fed by dilution into fresh medium.

يتم زرع الخلايا الغير ملتصقة في وسط غذائي طازج و مخفف.

3.4.2 Adherent cultures / زراعت الخلايا الملتصقة

Adherent cultures that do not need to be divided can simply be fed by removing the old medium and replacing it with fresh

زراعت الخلايا الملتصقة التي لا تحتاج للتقسيم يمكن بسهولة تغذيتها عن طريق إزالة الوسط الغذائي القديم

medium.

و استبداله بوسط غذائي جديد وطازج.

When the cells become semi-confluent, several methods are used to remove the cells from the growing surface so that they can be diluted.

وعندما تصبح الخلايا شبه منتفخة, يمكن إستعمال عدة طرق لإزالتها من السطح المغذي لذا يجب تخفيفه.

3.4.2.1 Mechanical / ميكانيكيا

A rubber spatula can be used to physically remove the cells from the growth surface. This method is quick and easy but is also disruptive to the cells and may result in significant cell death. This method is best when harvesting many different samples of cells for preparing extracts.

يمكن إستعمال الملعقة المطاطية لإزالة الخلايا عن السطح المغذي .هذه الطريقة سريعة و سهلة و لكنها تؤدي إلى اضطراب الخلايا و موتهم. هذه الطريقة مفضلة عند حصاد عدة أنواع من الخلايا لإعداد المستخلصات.

3.4.2.2 Proteolytic enzymes / أنزيمات التحلل البروتييني

Trypsin, collagenase, or pronase, usually in combination with EDTA, causes cells to detach from the growth surface. This method is fast and reliable but can damage the cell surface by digesting exposed cell surface proteins. The proteolysis reaction can be quickly terminated by the addition of complete medium containing serum

التريبسين , الكولاجوناز , أو البروناز , وعادةً يخلط مع أي دي تي أ, والسبب لنزع الخلايا من السطح المغذي . هذه الطريقة سريعة و موثوقة ولكنها تسبب في تدمير سطح الخلايا من خلال هضم البروتيينات الموجودة على سطح الخلية. ردّ فعل التحلل البروتييني يمكن إيقافته بسرعة بزيادة وسط غذائي كامل يحتوي على المصل.

3.4.2.3 EDTA / أ دي تي أ

EDTA alone can also be used to detach cells and seems to be gentler on the cells than trypsin.

EDTA يمكن أن يستعمل وحده لفصل الخلايا ومن الملاحظ أنّه ألطف من التريبسين.

3.4.2.4 Procedure for detaching cells / الإجراءات المعتادة لفصل الخلايا الملتصقة

The standard procedure for detaching adherent cells is as follows:

الإجراءات المعتادة لفصل الخلايا الملتصقة هي:

1. Visually inspect daily

1. الفحص النظري

2. Release cells from monolayer surface

2. إصدار الخلايا من طبقة الخلايا السطحية.

3. wash once with a buffer solution

3. ا أغسل مرة واحدة بالمحلول العازل

4. treat with dissociating agent

4. عالج العوامل المتفككة .

5. observe cells under the microscope

5. راقب الخلايا تحت المجهر.

6. Incubate until cells become rounded and loosen when flask is gently tapped with the side of the hand.

6. احضن الخلايا إلى أن تصبح دائرية .

7. Transfer cells to a culture tube and dilute with medium containing serum.

7. انقل الخلايا إلى أنبوب زراعي و خففه بالوسط (medium) المحتوي على المصل.

8. Spin down cells, remove supernatant and replace with fresh medium.

8. تدور الخلايا في الأسفل , لذا يجب إزالة الطبقة العائمة و استبدالها بوسط طازج .

9. Count the cells in a hemacytometer, and dilute as appropriate into fresh medium.

9. احسب الخلايا في الهيموسيتومتر ,وخففه حسب الطلب بوسط طازج.

3.5 Media and growth requirements / *متطلبات الوسط الغذائي والنمو*

3.5.1 Physiological parameters / المقاييس الفزيولوجية

- temperature - 37C for cells from homeother
- pH - 7.2-7.5 and osmolality of medium must be maintained
- humidity is required
- gas phase - bicarbonate conc. and

- درجة حرارة الخلية 37 .
- يجب المحافظة على درجة الحموضة بين 7.2-7.5 و على osmolality of medium
- المحافظة على الرطوبة المطلوبة.
- المحافظة على توازن طبقة الغاز_كمية

CO_2 tension in equilibrium

البيكربونات_و ثاني أوكسيد الكربون.

- visible light - can have an adverse effect on cells; cells should be cultured in the dark and exposed to room light as little as possible

- الضوء المرئي_يستطيع أن يلحق ضرر بالخلايا, لذا تجب أن تزرع الخلايا في الظلام وأن لا تعرض للضوء على أكبر قدر ممكن.

3.5.2 Medium requirements (often empirical) / متطلبات الوسط الغذائي (غالباً تجريبي)

- Bulk ions - Na, K, Ca, Mg, Cl, P, Bicarb or CO_2
- Trace elements - iron, zinc, selenium
- sugars - glucose is the most common
- amino acids - 13 essential
- vitamins - B, etc.
- choline, inositol
- serum - contains a large number of growth promoting activities such as buffering toxic nutrients by binding them, neutralizes trypsin and other proteases, has undefined effects on the interaction between cells and substrate,and contains peptide hormones..
- antibiotics - although not required for cell growth, antibiotics are often used to control the growth of bacterial and fungal contaminants.

- معظم الإيونات هم من السوديوم ,البوتاسيوم ,الكالسيوم ,المانييزيوم ,الكلور ,الفوسفور ,البيكاربونات ,أو ثاني أوكسيد الكربون.
- العناصر المؤثرة هم الإيرون ,الزنك ,السلينيوم .
- السكر :الأكثر شيوعاً هو الغلوكوز .
- الحمض الأميني : هم 13 الأساسين .
- الفيتامين :ب, ...
- الكولين ,الإينوزيتول.
- المصل :يحتوي على عدد كبير من العوامل المساعدة للنمو مثل التواصل مع عازل المواد الغذائية السامة .و التي تعمل على توقيف عمل التريبسين (Trypsin) و غيره من البروتييز (proteases) وآثاره الغير معروفة بتفاعله بين الخلايا و الطبقة التحتية و هو يحتوي على هورمون الببتيد (peptide).
- المضادات الحيوية :بالرغم من أنها غير مطلوبة لنمو الخلايا , إلاّ أناه عالباً ما تستعمل للتحكم بنمو البكتريا و الفطريات الملوثة.

3.5.3 Feeding / التغذية

2-3 times/week

التغذية من 2-3 مرات في الأسبوع

3.5.4 Measurement of growth and viability / مقياس النمو و القدرة على العيش

The viability of cells can be observed visually using an inverted phase contrast microscope. Live cells are phase bright; suspension cells are typically rounded and somewhat symmetrical; adherent cells will form projections when they attach to the growth surface. Viability can also be assessed using the vital dye, trypan blue, which is excluded by live cells but accumulates in dead cells. Cell numbers are determined using a Hemacytometer.

يمكن أن نتأكد من وجود الخلايا بواسطة الميكروسكوب . فالخلايا الحية توجد في الطبقة الضوئية ,أمّا الخلايا المعلقة عادةً تكون دائرية ومتماثلة إلى حد ما , الخلايا الملتصقة ستسقط عندما تعلق على سطح النمو ويمكن إستعمال التريبان الأزرق (trypan blue) لتحديد أكثر بين الخلايا الحية و الخلايا الميتة فيعطي اللون الأزرق للخلايا الميتة فقط. و يمكن حساب عدد الخلايا بإستعمال الهيماسيتومتر (Hemacytometer).

3.6 Safety considerations / *إرشادات السلامة*

Assume all cultures are hazardous since they may harbor latent viruses or other organisms that are uncharacterized.

The following safety precautions should also be observed:

- pipetting: use pipette aids to prevent ingestion and keep aerosols down to a minimum
- no eating, drinking, or smoking
- wash hands after handling cultures and before leaving the lab
- decontaminate work surfaces with disinfectant (before and after)
- autoclave all waste
- use safety cabinet when working with hazardous organisms.

جميع الخلايا المزروعة تحمل الخطر منذ وجود الفيروس أو الكائنات الأخرى الغير معروفة . لذلك أن تؤخذ إحتياطات السلامة التالية بعين الإعتبار:

- عملية الإمتصاص (pipetting) :يجب إستعمال الممصة(pipette) لمنع دخول الهواء في السوائل والمحافظة على انخفاض كميته إلى أدنى مستوى.
- عدم الأكل , الشرب , أو التدخين.
- غسل الأيدي بعد العمل في زرع الخلايا وقبل ترك المختبر.
- تنظيف أسطح العمل وتطهيرهم (قبل و بعد).
- تعقيم جميع الأواني.
- إستعمال حجرة الأمان (safety cabinet) عند العمل بالكائنات الخطرة .

- use aseptic technique
- إستعمال تقنية التعقيم.
- dispose of all liquid waste after each experiment.
- التخلص من جميع النفايات السائلة بعد كل تجربة.

3.7 Tissue culture procedures / *إجراءات زراعة الأنسجة*

The cells should be monitored daily for morphology and growth characteristics, fed every 2 to 3 days, and subcultured when necessary. A minimum of two 25 cm^2 flasks should be carried for each cell line. Each time the cells are subcultured, a viable cell count should be done, the subculture dilutions should be noted, and, after several passages, a doubling time determined. As soon as you have enough cells, several vials should be frozen away and stored in liquid N_2. One vial from each freeze down should be thawed 1-2 weeks after freezing to check for viability. These frozen stocks will prove to be vital if any of your cultures become contaminated.

يجب أن تراقب الخلايا يومياً من حيث شكلها وخصائص نموها , وتغذيتها كل 2 أو 3 أيام ,و إعادة زراعتها (subcultured) عند الضرورة. يجب إعداد إثنين من القوارير 25سم^2 على الأقل لكل خط من الخلية ,في كل مرة يتم (subcultured) الخلية يجب حساب الخلايا القابلة للنمو وتخفيف (subcultured) , وبعد عدة مراحل نحدد ضعف الكمية.و في أسرع وقت يجب تجميد ما لديك من الخلايا في عدة قوارير ثم تخزينها في سائل النيتروجين (N_2).و نذوب عينة من كل تخزين بعد 1-2 أسبوعين من التجميد لنتحقق من صلاحيتها و لنتأكد من أن الخلايا حية و خالية تماماً من أي تلوث.

the minimal nutritional requirements of cultured cells :mixture of salts, amino acids, vitamins and cofactors, carbohydrates, and horse serum. By eliminating one component at a time , then determined which nutrients were essential for cell growth. His minimum essential medium (MEM) contains 13 amino acids (human tissue in vivo requires only eight), 8 vitamins and cofactors, glucose as an energy source, and a physiological

الحد الأدنى من المتطلبات الغذائية لزراعة الخلايا يتكون من: خليط من الأملاح أحماض أمينية , فيتامينات و العوامل المساعدة له, الكربوهيدرات و مصل الحصان . و من خلال القضاء على عنصر واحد في وقت واحد يتم تحديد العناصر الغذائية الضرورية لنمو الخلايا. (MEM)يحتوي على 13 عنصر من الحمض الأميني (أنسجة الإنسان داخل الجسم تتطلب 8 منهم فقط).8 من الفيتامين و العوامل المساعدة له ,الغلوكوز كمصدر للطاقة , ومحلول الأملاح الفيزيولوجية المتساوية مع الخلية

. درجة الحصموضة تثبت على 7.2 إلى 7.4 بإستعمال كاربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) بتوازن مع ثاني أوكسيد الكربون (CO_2) و مؤشر درجة الحموضة للفينول الأحمر (Phenol red) عادةً ما يستخدم في الوسط (medium), ليعطي اللون الأحمر الأرجواني إذا كان الوسط (basic) واللون الأصفر إذا كان (acid) واللون الأحمر الليموني إذا كان في نطاقه الصحيح.

يجب إضافة 1إلى 10 %من تركيزات(concentrations) المصل على الوسط مع إضافة ضعف العوامل المحددة لزيادة عدد الخلايا. والتي بدونها لن تنمو معظم الخلايا . الكثير من خلايا الثديات تحتضن على 37 درجة مئوية , أما خلايا الطيور , الزواحف والمفصليات قد تنمو أفضل على درجة أعلى أو أدنى من 37م° .

salt solution that is isotonic to the cell. The pH is maintained at 7.2 to 7.4 by $NaHCO_3$ in equilibrium with CO_2. The pH indicator phenol red is usually incorporated into the medium; it turns red-purple if the medium is basic, yellow if the medium is acidic, and remains red-orange if the pH is in the right range.

Serum in concentrations of 1 to 10% must be added to the medium to provide the cells with additional poorly defined factors, without which most cells will not grow. Most mammalian cells are incubated at 37°C; avian, reptilian, and arthropod cells may grow best at higher or lower temperatures.

3.7.1 Subculturing adherent cells / الزراعة الفرعية للخلايا الملتصقة

عندما تصبح الخلايا شبه متراكمة, تستخدم الزراعة الفرعية 2Mm من أسيد ايتيلين ديامين تترأأستيك (EDTA) أو التريبسين /EDTA.

When adherent cells become semi-confluent, subculture using 2 mM EDTA or trypsin/EDTA.

3.7.2 Trypsin-EDTA / EDTA - التريبسين

- إزالة الوسط من علبة الزراعة و غسل الخلايا بمحلول الملح المتوازن من دون الكالسيوم (Ca++) أو المغنزيوم (Mg++) ثم إزالته.
- إضافة ما يكفي من محلول التريبسين –

- Remove medium from culture dish and wash cells in a balanced salt solution without Ca++ or Mg++. Remove the wash solution.
- Add enough trypsin-EDTA solution to

cover the bottom of the culture vessel and then pour off the excess.

EDTA لتغطية أسفل وعاء الزراعة ثم إضافة القليل فوق ذلك.

- Place culture in the 37°C incubator for 2 minutes.

- ضع الخلايا المزروعة في الحاضنة على 37 م° لمدة 2 دقيقتين .

- Monitor cells under microscope. Cells are beginning to detach when they appear rounded.

- راقب الخلايا تحت المجهر . يبدأ فصل الخلايا عندما تصبح دائرية .

- As soon as cells are in suspension, immediately add culture medium containing serum. Wash cells once with serum containing medium and dilute

- وبمجرد أن الخلايا أصبحت في التعليق (suspension) أضف فوراً الوسط المغذي الذي يحتوي على المصل .ثم إغسل الخلايا مرة واحدة بالوسط المخفف.

3.7.3 EDTA alone / وحده EDTA

- Prepare a 2 mM EDTA solution in a balanced salt solution (i.e., PBS without Ca^{++} or Mg^{++}).

- حضر محلول 2mM EDTA في محلول الملح المتوازن (مثل PBS من دون الكالسيوم أو المعنزيوم).

- Remove medium from culture vessel by aspiration and wash the monolayer to remove all traces of serum. Remove salt solution by aspiration.

- أزال الوسط الغذائي من وعاء الزراعة بواسطة الشفط (aspiration) و إغسل طبقة الخلايا جيداً لإزالة أي أثر من المصل . إزالة محلول الملح بواسطة الشفط.

- Dispense enough EDTA solution into culture vessels to completely cover the monolayer of cells.

- وضع كمية صغيرة من محلول EDTA داخل وعاء الزراعة لتغطية الخلايا فقط .

- The coated cells are allowed to incubate until cells detach from the surface. Progress can be checked by examination with an inverted microscope.

- أحضن الخلايا المعلقة أن تنفصل من السطح .ثمّ راقب تتطورها من خلال الفحص بالمجهر

- Dilute cells with fresh medium and transfer to a sterile centrifuge tube.

- خفف الخلايا بوسط طازج وأنقله إلى أنبوب نابذ معقم (sterile centrifuge tube).

3.7.4 Thawing frozen cells / تذويب الخلايا المجمدة

Remove cells from frozen storage and quickly thaw in a 37°C waterbath.

إزالة الخلايا من الثلاجة و تذويبها على 37 م° في الماء المسخن (waterbath).

3.7.5 Freezing cells / تجميد الخلايا

- Harvest cells as usual and wash once with complete medium.
- Resuspend cells in complete medium and determine cell count/viability.
- Centrifuge and resuspend in ice-cold freezing medium: 90% calf serum/10% DMSO or glycerol with ethylene glycol , at 10^6 - 10^7 cells/ml. Keep cells on ice.
- Transfer 1 ml aliquots to freezer vials on ice.
- Place in a Mr. Frosty container that is at room temperature and that has sufficient isopropanol.
- Place the Mr. Frosty in the -70°C freezer overnight. Note: Cells should be exposed to freezing medium for as little time as possible prior to freezing
- Next day, transfer to liquid nitrogen (DON'T FORGET).

- حصد الخلايا كالعادة و غسلها مرة واحدة بالوسط الكامل.
- حدد الخلايا الموجودة داخل الوسط .
- أنبذ (centrifuge) و ضع الخلايا التي في الأسفل في وسط بارد مجمد يتكون من: 90% مصل العجل(10% DMSO) الديميمل سلفوكسيد أو الغليسرول مع الإتيلين غليكول(ethylene glycol)على 10^7 – 10^6 خلية\مل . إحفظ الخلايا بالثلج.
- أنقل 1 مل من السائل (aliquot) إلى قارورة الثلج على الجليد.
- ثم ضعه في وعاء السيد فروستي (Mr. Frosty) على درجة حرارة الغرفة و الذي يوجد فيه كمية كافية من الإيزوبروبانول (isopropanol).
- ضع وعاء السيد فروستي (Mr. Frosty) في الثلاجة على 70م° طوال الليل . ملاحظة : الخلايا يجب أن تكون معرضة للوسط المتجمد قبل تثليجها بفترة قصيرة.
- في اليوم التالي أنقلهم إلى السائل النيتروجيني (liquid nitrogen) (لا تنسى).

3.7.6 Viable cell counts with Hemacytometer / حساب الخلايا الحية

USE A HEMACYTOMETER TO DETERMINE TOTAL CELL COUNTS AND

إستعمل الهيموسيتومتر (HEMACYTOMETER)

VIABLE CELL NUMBERS.

Blue is one of several stains recommended for use in dye exclusion procedures for viable cell counting. This method is based on the principle that live cells do not take up certain dyes, whereas dead cells do.

- Prepare a cell suspension, either directly from a cell culture or from a concentrated or diluted suspension and combine 20 µl of cells with 20 µl of trypan blue suspension (0.4%). Mix thoroughly and allow to stand for 5-15 minutes.
- With the cover slip in place, transfer a small amount of trypan blue-cell suspension to both chambers of the Hemacytometer by carefully touching the edge of the cover slip with the pipette tip and allowing each chamber to fill by capillary action. Do not overfill or underfill the chambers.
- Starting with 1 chamber of the Hemacytometer, count all the cells in the 1 mm center square and four 1 mm corner square. Keep a separate count of viable and non-viable cells.
- If there are too many or too few cells to count, repeat the procedure either concentrating or diluting the original suspension as appropriate.
- Include cells on top and left touching middle line. Do not count cells touching middle line at bottom and right. Count 4 corner squares and middle square in both chambers

لتحديد عدد جميع الخلايا و عدد الخلايا الحية .

اللون الأزرق هو واحد من عدة طرق تستعمل في إجراءات صبغ الخلايا المية . وتستند هذه الطريقة على مبدأ صبغ الخلايا الميتة بينما الخلايا الحية لا تلون.

- حضر الخلايا المعلقة إمّا مباشرةً من الخلايا المزروعة أو من التركيز أو من التعليق المخفف و إجمع 20ميكرو ليتر من الخلايا مع 20 ميكرو ليتر من التريبان الازرق المعلق (0.4%) .أخلط المزيج على مهل و اتركه لمدة – 5-15 دقيقة .
- إزل الغطاء عن مكانه , أنقل كمية صغيرة من الخلايا المعلقة مع التريبان الأزرق (trypan blue) إلى الناحيتين من الهيموسيتومتر (Hemacytometer) بعناية من خلال لمس حافة زلة الغطاء مع أنبوب الممصة والسماح لكل جهة بالإمتلاء . إنتبه أن لا تفيض أو تنقص الحفر داخل الهيموسيتومتر .
- إبدأ بأول حفرة من الهيموسيتومتر , أحسب جميع الخلايا في 1 مم من مركز المربع و أربعة من 1 مم من زاوية المربع . حافظ على فصل عدد الخلايا الحية عن الخلايا الميتة .
- إذا كان هناك أيضاً العديد أو القليل من عدد الخلايا ,أعد إجراء عملية إمّا التركيز وإمّا التخفيف من التعليق الأصلي حسب الحاجة .
- أدخل الخلايا على أعلى و يسار خط الوسط الملموس .لا تحسب الخلايا على أسفل و يمين خط الوسط

and calculate the average

- Each large square of the Hemacytometer, with cover-slip in place, represents a total volume of 0.1 mm^3 or 10^{-4} cm^3. Since 1 cm^3 is equivalent to approximately 1 ml, the total number of cells per ml will be determined using the following calculations:Cells/ml = average cell count per square x dilution factor x 10^4;
- Total cells = cells/ml x the original volume of fluid from which the cell sample was removed; % Cell viability = total viable cells /total cells x 100.

الملموس . عدّ أربع زواية من المربع و وسط المربع في كلا الحفرتين و أحسب المتوسط منهم .

- كل مربع كبير من الهيموسيتومتر , يمثل إجمالي حجم 0.1 مم^3 أو$^{-4}$10 سم^3 منذ 1 سم^3 يعادل ما يقارب 1 مل , عدد جميع الخلايا بال مل يحدد باستخدام الحسابات التالية : الخلية\مل=متوسط عدد الخلايا بالمربع x العامل المخفف x 10^4 ,

مجموع الخلايا = الخلايا \ مل x الحجم الأصلي للسائل الذي تم منه إزالة عينة المخلية, نسبة الخلايا الحية %= مجموع الخلايا الحية \مجموع الخلايا x 100.

4 Protocol: Culture of primary chicken embryo fibroblast (CEF) cells / برتوكول: الزراعة الأولية لخلايا جنين بيضة الدجاج

4.1 Materials / *المواد*

- 10 to 12 day old embryonated eggs.

- بيض ملقح من عمر 10 إلى 12 يوم .

- Sterile 125 ml Erlenmeyer flask with magnetic stir bar.
- Sterile 25 cm^2 flask containing MEM (Minimum Essential Medium Eagle) plus 10% fetal calf serum.
- Sterile 0.5% trypsin in saline A.
- Sterile 15 ml centrifuge tube containing 0.5 ml of serum.
- Sterile saline A

- 125 مل دورق إرلنمير مع قضيب تحريك مغناطيسي.
- 25 سم^2 دورق معقم يحتوي على أم اي أم (MEM) مع 10% من مصل جنين العجل.
- 0.5 % من التريبسين في السالين أ.
- 15 مل من أنبوب نابذة معقم يحتوي على 0.5 مل من المصل.
- سالين أ معقم.

4.1.1 Preparation of Saline A / صناعة سالين أ

Ingredient	g/l
NaCl	8
KCl	0.4
NaHCO3	0.35
Glucose	1
Phenol red	0.05

Add distilled H_2O to 1 litre. Filter sterilize. Saline A is usually prepared as a 10X solution and stored at -20 ˚C

4.1.2 Minimum Essential Medium Eagle (MEM) / صناعة أم اي أم

Ingredient	g/l
$CaCl_2.H_2O$	0.265
$MgSO_4$	0.09767
KCl	0.4
NaCl	6.8
NaH_2PO_4	0.122
L-arginine.HCl	0.126

L-cystine.HCl	0.0313
L-histidine.HCl.H_2O	0.042
L-isoleucine	0.052
L-leucine	0.052
L-lysine.HCl	0.0725
L-methionine	0.015
L-phenylalanine	0.032
L-threonine	0.048
L-tryptophan	0.010
L-tyrosine 2Na.2H_2O	0.0519
L-valine	0.001
Folic acid	0.001
myo-Inositol	0.002
Niacinamide	0.001
D-Pantothenic acid (calcium)	0.001
Pyridoxal.HCl	0.001
Riboflavin	0.0001
Thiamine.HCl	0.001
Glucose	1.0
Phenol red	0.011
$NaHCO_3$	2.2

Add distilled H_2O to 1 liter. Filter sterilize. Minimum essential medium Eagle is usually purchased as a preweighed mixture or as a sterile solution. The above formulation has Earle's salts.

4.2 Devices / الاجهزة/

- Incubator — حاضنة
- Centrifuge — نابذة
- Forceps and scissors — ملقط و مقص
- Alcool — كحول

- Sterile Petri dish — علبة بتري معقمة.

- Hema-cytometers — هموسيتوميتر.

- 1ml and 10ml pipettes

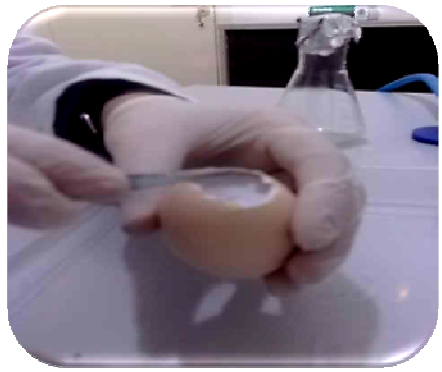
- 1 مل إلى 10 مل من حجم الممصة.

4.3 Protocol

1-Desinfect the surface of the egg over the air sac with scissors or forceps, break the shell.

1- طهر سطح البيضة من جهة الكيس الهوائي ثم إكسر البيضة بواسطة المقص أو الملقط.

2-Sterilize forceps by dipping in alcool and flaming. Cool forceps, then peel away the shell over the air sac



2- عقم الملقط بإغماسه بالكحول ثم ضعه فوق النار . برد الملقط ,قشّر قشرة البيضة من جهة الكيس الهوائي.

3-Sterilize forceps again, and pull back the shell membrane and chorioallantoic membrane to expose the embryo.

3- أعد تعقيم الملقط ,ثم إسحب غشاء القشرة و عشاء الكوريوألونتويك لإظهار الجنين .

4-Resterilize the forceps, graps the embryo loosely around the neck, and remove the entire embryo from the egg to a sterile Petri dish.

4- أعد تعقيم الملقط ,و على مهل ضعه حول عنق الجنين و إسحبه من البيضة بشكل كامل و ضعه في علبة بتري المعقمة.

5-Using forceps + scissors decapitate and eviscerate the embryo. Mince the embryo carcass into very small fragment with scissors .

5- إستعمل الملقط و المقص لقطع رأس و إزالة إحشاء الجني. ثم بواسطة المقص قطع جثّة الجنين إلى أجزاء صغيرة جداً.

6- Add about 10ml sterile saline A to tissue fragment in the Petri dish,

6- أضف حوالي 10 مل من سالين أ المعقم إلى أجزاء الخلايا الموجودة في علبة بتري ,

Swirl gently for 1 to 2 minutes, and carefully pour the entire content into a 125 ml Erlenmeyer flask ,tilt flask ,for decant saline A. Discard the saline A.

حرك بنوعومة من 1 إلى 2 دقائق , ثم بحذر ضع المحتوى في 125 مل دورق إرلنمير , أمل الدورق لفصل السالين . إرمي السالين.

7-Add 10 ml of sterile warm trypsin and pour into centrifuge filtrate at 1000 rpm for 10 minutes ,discard

7-أضف 10مل من التريبسين المعقم الساخن لمدة 10 دقائق .ثم ضعه في أنبوب نابذ مع فلتر على 1000 أر ب أم لمدة

supernatant and resuspend the cells in 20 ml growth medium .

8-Mix well for counting in a hemacytometer.

N.B: be sure to keep your cell sterile.

9-Dilute 0.1ml of cell suspension with 0.9ml of MEM and count cell in a hemacytometer

10-Adjust concentration to $5*10^5$ cells per ml growth medium and dispense into cultures tubes.

11-Incubate at 37˚c until monolayered (6-7 days).

Note: be sure examine cell culture each day ,if the medium is yellow may need to be adjust by 7.5%$NaHCO_3$ .if floating cell are present or the color of the medium indicate a basic PH the medium should be changed.

10 دقائق , إرمي من مرّ بالفلتر و ضع من بقي من الخلايا في 20 مل من المستنبت المغذي.

8-أمزج جيداً المحتوى لنحصيه في الهيماسيتوميتر .

ملاحظة: تأكد من أن تحافظ على الخلايا معقمة.

9-خفف 0.1 مل من الخلايا المعلقة في 0.9 مل من أم أو أم و إحصي الخلايا في الهيماسيتوميتر.

10-أضبط الكمية على $5*10^2$ من الخلايا في ليتر و وزعه في أنابيب التغذية.

11-أحضنهم على 37 درجة مئوية إلى أن يصبحوا خطاً واحداً من الخلايا (6-7 ايام).

ملاحظة: تأكد من فحص الخلايا يومياً ,إذا كان الوسط ذو لون أصفر فهو بحاجة إلى تعديل بواسطة 7.5% من الهيدروجينو كاربونات الصوديوم .أمّا إذا عامت الخلايا أو كان الوسط يشير على أنّه بازيك هذا الوسط يجب أن يتغير .