**مختبر الفايروسات**

***الخطوات الأساسية لتحضير المزارع الابتدائية في المختبر***

Principles Steps of preparing primary culture in Lap

تعرف المزرعة الابتدائية او الأولية primary culture بأنها المزرعة التي يتم الحصول عليها من خلايا او انسجة او أعضاء مأخوذه مباشرة من الحيوانات المختبرية الحية وتتلخص بالخطوات التالية:

**أولا**:تحضير العضو المرغوب فيه preparing of desired animal organ

يؤخذ العضو المراد تحضير مزرعة ابتدائية منه من الحيوان المختبري المخدر ويتم غسل العضو بمحلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي PBS معقم لإزالة بقايا الدم والانسجة الغير مرغوب فيها كالدهون والغضاريف ثم يوضع في قنينة معقمة مع وسط زرعي معقم كامل complete media صلب solid او شبه صلب semi solid حاوي على الاكار Agar مكونا بذلك مزرعة الأعضاء organ culture التي تتألف بدورها من انسجة متمايزة Differentiated tissue ويحضن في الحاضنة بدرجة حرارة cᵒ37 وبعد فترة الحضانة فأن الخلايا الجديدة المنقسمة ستخرج الى الوسط الزرعي وبعد عدة أيام يمكن إزالة هذا العضو واضافة وسط زرعي كامل جديد كي تنمو الخلايا المنقسمة القليلة في الوسط وهي طريقة محدودة الاستخدام ولايكمن الاحتفاظ بهذا النوع من المزارعطويلا وذلك:

1. لعدم قدرة جميع الخلايا على الانقسام والنمو بنفس المعدل
2. كون الخلايا المطلوب تنميتها قليلة العدد ضمن العينة
3. صعوبة حصول الخلايا الداخلية في العضو المزروع على المغذيات والاوكسجين لعدم وجود الاوعية الناقلة (الجهاز الوعائي الدموي) حيث تتغذى الخلايا بالانتشار Diffusion مما يؤدي الى حدوث تنخر Necrosis في داخل الخلايا لعدم حصولها على المغذيات الأساسية.

**ثانيا:**تفريق الخلايا Dispertion of cell

يتم تفريق الخلايا لتحضير مزارع الانسجة Tissue culture ومزارع الخلايا cell culture حسب نوع النسيج المأخوذ من الحيوان المختبري حيث تقسم الى :

1-انسجة لاتحتاج الى تقطيع بعد اخذها من الكائن المجهز مثل الدم Blood

2- انسجة تحتاج الى تقطيع ميكانيكي Mechanical sectioning حيث يقطع العضو الحيواني الى قطع صغيرة ميكانيكيا في وسط زرعي Free media خالي من المصل لمنع جفاف الخلايا

بأستخدام المجانس Homogenizer او بأستخدام المقص وغيرها من الأدوات الحادة وبعدها يرشح عبر شاش معقم للتخلص من الأجزاء الكبيرة ومن يثم يعامل العامل الخلوي بأستخدام محلول التربسين لتفكيك الروابط مابين الخلايا وتتم العملية بطريقتان:

طريقة التربسين البارد Cold Tyrpsinization وطريقة التربسين الدافئ Hot Trypsinization

كما يستخدم محلول Trypsin EDTA حيث يعمل ال EDTA على إزالة ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم من القالب Matrix كما تعمل ايونات الكالسيوم والمغنيسيوم على زيادة مقاومة الخلايا للهضم Digestion.

كما يستخدم Collagenase بدلا من التربسين في هضم الالياف الكولاجينية التي تربط الخلايا مع بعضها البعض.

***ثالثا:***غسل الخلايا Washing cell

يعاد غسل او تعليق الخلايا بالطرد المركزي Centerifugation لعدة مرات بأضافة العالق الخلوي في وسط زرعي خالي من المصل للتخفيف من تأثير انزيم التربسين ومن ثم يضاف الى وسط زرعي كامل لغرذ التنمية.

***رابعا:***عد الخلايا Counting cell

تؤخذ قطرة من العالق الخلوي من الراسب بعملية الطرد المركزي وتوضع على ردهة عد الخلايا Counting chamber لغرذ عد الخلايا الحية والميتة في 100 مل من الوسط الزرعي بعد معاملتها بالصبغات الحيوية مثل صبغة التريبان الزرقاء Trypan blue حيث الخلايا الحية تكون غير مصبغة بينما تصبغ الخلايا الميتة وذلك بوضع %0.1 من صبغة التريبان الزرقاء وتترك لمدة 2 دقيقة.

***خامسا:*** حضن الخلايا Incubation of cell

تحضن المزارع الخلوية لمدة(48\_24) ساعة في حاضنة درجة حرارتها cᵒ37 وتفحص المزارع يوميا للتأكد من التصاق الخلايا وملائمة الوسط لنمو الخلايا وعدم تلوث المزارع. عندما تشغل الخلايا 50% من سطح قنينة الزرع يفضل عمل مزارع ثانوية Passage or sub-culturing وذلك بأهمال الوسط الزرعي القديم وفصل الخلايا من سطح القنينة بأضافة 2-1 مل من التربسين ويعاد تعليق الخلايا بوسط زرعي كامل.

***سادسا:*** تلقيح المزارع الخلوية Inoculation of cell culture

بعد تكون Monolayar من المزرعة الخلوية تتم إزالة الوسط الزرعي الكامل وتلقح Inoculation المزرعة الخلوية cell culture بعالق فايروسي viral suspention وتحضن بدرجة الحرارة للفايروس المحقون ليتم الادمصاص adsorbtion ل (2-1) ساعة بدلا من الوسط الزرعي الكامل او الوسط الزرعي للادامة Maintenance media ومن ثم يتم عزل الفايروس Isolation بطرق العزل المختبرية لغرض الدراسة.

***أنواع الأوساط الزرعية***

***Typed of culturing media***

1. الأوساط الزرعية للادامة Maintenance media

هي الأوساط الزرعية الحاوية على كمية قليلة من المصل حيث تكون %1 بدلا من %(20-10) مضافا اليه Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

او Glycerol لمنع تكون بلورات الثلج ثم تحفظ في مجمدات خاصة بدرجة حرارة (90-\_70-) او حاويات النتروجين السائل 196⁻ Liquid Nitrogen حيث تستخدم للمحافظة على المزارع الخلوية وادامتها لفترات طويلة من الزمن تصل الى سنوات حيث تبقى الخلايا محافظة على حيويتها بأقل معدل ايضي.

1. الأوساط الزرعية النامية Growth or complete media

وهي الأوساط الزرعية الكاملة التي تحتوي على% (20-10) من المصل ومعظم المغذيات لنمو الفايروس وتستخدم لغرض تنمية الخلايا وتكثيرها في درجة حرارة الحاضنة عند الحضن او في الثلاجة cᵒ4 او المجمدة cᵒ20 عند حفظ الخلايا لاسابيع .

3-الأوساط الزرعية الخالية من المصل Free media

وهي الأوساط الزرعية الخالية من المصل تستخدم للحفاظ على ازموزية الخلايا وحيويتها ومنعها من الجفاف والتلف اثناء تحضيرها بالتقطيع الميكانيكي والكيميائي في التجارب المختبرية.

***العوامل المؤثرة على نمو الخلايا في المزرعة الخلوية***

1. درجة الحرارة Temperature

هي احد الصفات المميزة للانسجة الخلوية حيث تزداد بدرجات ضئيلة لاتتجاوزcᵒ(3-2) كحد اعلى للخرارة اللازمة لاستطالة الخلايا ضمن المزرعة ويعد المدى الحراري لمعظم الخلايا هو cᵒ(38-37) حيث ان تضاعف الفايروس يستحث او يثبط تبعا للمدى الحراري. ومن المميزات الأساسية للحرارة يستفاد منها في حفظ الخلايا في المزارع الخلوية لمدة أسابيع ضمن ظروف cᵒ(10-3) ولفترات أطول تصل الى سنوات يعمل معلق لمزرعة خلوية ويضاف له الكليسرول او DMSO في التجميد السريع للمحافظة على حيويتها.

2-تركيز ايون الهيدروجين PH

وهو من الشروط المهمة للمحافظة على اعلى مستوى نمو والذي يكون من الأفضل 7.4 وتتأثر هذه القيمة نتيجة التغيرات الخلوية المرضية بسبب تكاثر الفايروس لذلك نحافظ على PH سائل المزرعة الخلوية بواسطة إضافة كاشف الفينول الأحمر او بيكربونات الصوديوم الهيدروجينية او خفض تركيز سكر الكلوكوز.

3-حالة الغازات Gaseous condition

ان الغازات لتي تحتاجها الخلايا في نموها هما الاوكسجين O2 او ثنائي أوكسيد الكاربون Carbon dioxide CO2 ويكون المحتوى الغازي لمحيط المزرعة الخلوية الأمثل حاوي على نسبة %5 من غاز ثنائي أوكسيد الكاربون والتي تحافظ على ادامة مستوى الدالة الحامضية المناسب لنمو الخلايا والتي تزودها الحاضنات الخاصة CO2 Incubator في الجو المحيط للمزرعة الخلوية.