

## کشت یاخته‌های شناور هلا برای تولید آنتی ژنهای ویروسی

ناصر نصرتی M.Sc.\*، محمدحسن روستایی Ph.D.\*، حوریه سلیمان‌جاهی M.Sc.\*

\* دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ویروس‌شناسی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، گروه ویروس‌شناسی

### چکیده

**هدف:** راه اندازی کشت یاخته‌های هلا به منظور تولید آنتی ژنهای ویروسی  
**مواد و روشها:** یاخته‌های پایدار هلا (HeLa) ابتدا به صورت تک لایه کشت و سپس به ظروفی که برای کشت یاخته‌های شناور طراحی شده بود انتقال داده شدند. برای رشد یاخته‌ها از محیط (MEM) Minimum Essential Medium که حاوی ده درصد سرم استرپل‌گوساله بود استفاده شد. برای دستیابی به بهترین شرایط رشد یاخته‌ها، از بافر HEPES و برای حذف کلسیم، از کوبرکسی متیل سلولز (CMC) و اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) استفاده شد. پس از عادت دادن یاخته‌ها به کشت شناور، از آنها برای تکثیر ویروس‌های پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و ویروس آدنوتیپ ۵ استفاده شد و نتایج به دست آمده با آنچه از کشت یاخته‌های تک لایه به دست آمده بود مقایسه شد.

**یافته‌ها:** زمان دو برابر شدن یاخته‌های هلا در کشت تک لایه و کشت شناور با اپتیمم تعداد یاخته‌هایی که برای شروع کار مورد استفاده قرار می‌گیرد ارتباط ویژه‌ای دارد. بهترین تعداد برای کشت این یاخته‌ها در پلیتهای ۹۶ خانه‌ای استفاده از ۳۰۰۰۰۰ یاخته در یک میلی‌لیتر محیط کشت، و برای کشت معلق استفاده از ۴۰۰۰۰۰ در هر میلی‌لیتر محیط است. زمان دو برابر شدن برای کشت تک لایه حدود ۳۸ ساعت بود و تا ۸۰ ساعت بعد از شروع کشت، یاخته‌ها در فاز لگاریتمی تکثیر قرار داشتند، ولی فاز لگاریتمی تکثیر برای تکثیر یاخته‌های معلق حداکثر ۴۸ ساعت بود. هر دو کشت یاخته‌ها توانستند شرایط لازم را برای تکثیر ویروس‌های پولیو و آدنو ۵ فراهم کنند.

**نتیجه‌گیری:** برای دستیابی به کشت یاخته‌های شناور هلا لازم است تا غلظت یون کلسیم تا ۳/۸ برابر کاهش یابد، محیط کشت حاوی یاخته‌ها ۷۰ بار در دقیقه چرخانده و هوادهی مناسب انجام می‌شود، ولی به وجود CMC احتیاجی نیست. توانایی تکثیر ویروس‌های پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و ویروس آدنوتیپ ۵ در یاخته‌های تک لایه و معلق هلا یکسان است.

**کل واژگان:** کشت معلق، تولید آنتی ژن، ویروس‌های پولیو و آدنو ۵، آنتی ژن ویروسی، یاخته‌های هلا

نسبت انتقال یاخته‌ها و تقسیم آنها به ظروف جدید و حساسیت آنها به ویروس‌های پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و ویروس آدنوتیپ ۵ مشخص شد.

### \* کشت یاخته‌های شناور<sup>۵</sup>

برای کشت یاخته‌های هلا به صورت شناور از ظروف کشت شیشه به اسپینر<sup>۶</sup> با حجمهای مختلف که با توجه به امکانات طراحی شده بود استفاده و برابر با  $\frac{1}{3}$  حجم هر ظرف به آن محیط کشت حاوی یاخته‌های هلا اضافه شد. برای تعیین نسبت بذر یاخته‌ها که منجر به کسب بهترین نتیجه در روش کشت یاخته‌های شناور می‌شد، از غلظت‌های متفاوتی از این بذر استفاده شد.

### \* تعیین زمان دو برابر شدن یاخته‌های هلا

به منظور کسب آگاهی لازم برای دو برابر شدن یاخته‌های هلا کشت شده، به صورت تک لایه و شناور، هر ۲۴ ساعت یک بار نمونه ناشی از یاخته‌ها برداشت و با استفاده از محلول یک در هزار اریتروزین<sup>۷</sup> و PBS<sup>۸</sup> و PH برابر با  $7/4-7/2$  رنگ آمیزی و شمارش شد.

### \* عوامل موثر در کشت شناور

مواد مختلفی به کشت یاخته‌های شناور اضافه شد تا تأثیرشان بر روی شناوری یاخته‌ها و توان تکثیر آنها بررسی شود. این مواد شامل بافر هیپس HEPES به مقدار ۲۰ میلی مولار، CMC به مقدار یک هزارم در هر میلی لیتر محیط، EDTA به مقدار ۰/۰۵ گرم در یک میلی لیتر محیط، و تریپتوز فسفات برات<sup>۹</sup> به مقدار ۰/۰۳ گرم در هر میلی لیتر محیط کشت یاخته‌ها بود.

### \* آماده سازی بذرهای ویروس پولیوتیپ ۱، ۲، ۳

از بذر تپهای ۱، ۲، ۳ ویروس ضعیف شده پولیو (تپهای مورد مصرف در واکسن فلج اطفال) که از موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی دریافت شده بود برای تلقیح به یاخته‌های یک لایه و شناور هلا استفاده و نتایج به دست آمده از هر کدام از یاخته‌ها با یکدیگر مقایسه شد. برای آماده سازی این ویروسها ابتدا هر تیپ ویروس به طور جداگانه در کشت یک لایه یاخته‌های هلا تلقیح و یاخته‌ها به دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انتقال داده شد. پس از بروز آثار کامل بیماری زایی (CPE)<sup>۹</sup> در یاخته‌های تلقیح شده، آنها را به سرمای ۷۰- درجه انتقال داده، ذوب نموده و پس از سانتریفوژ نمودن به مدت ۱۵ دقیقه و ۳۰۰۰ دور در دقیقه از مایع رویی به عنوان مخزن ویروس استفاده شد. سپس این ویروس دو بار دیگر در یاخته‌های سالم پاساژ داده شد. بعد از جمع آوری ویروسها در آخرین پاساژ، عیار هر تیپ با استفاده از روش کاربیر<sup>۱۰</sup> تعیین شد (۱۱).

## مقدمه

کشت یاخته‌ها اولیه<sup>۱</sup> و یاخته‌ها تغییر شکل یافته<sup>۲</sup> از جمله روشهایی است که امروزه در تمام مراکز تحقیق، تشخیص و تهیه واکسنهای ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). با توجه به اینکه تهیه یاخته‌های اولیه که مستقیماً از بدن یک جانور زنده به دست می‌آید با مشکلات و مخارج بالایی همراه است بنابراین همیشه سعی می‌شود تا برای انجام روشهای مربوط به تشخیص عوامل بیماری زایی ویروسی و تحقیق در مورد آنها از یاخته‌های پایدار که می‌توانند پاساژهای نامحدود را تحمل کنند استفاده شود (۲). از جمله ویژگیهای یاخته‌های پایدار تغییر شکل یافته این است که می‌توانند به صورت معلق در محیط کشت تکثیر کنند، زیرا این یاخته‌ها احتیاج ندارند تا برای تکثیر به یک بستر سفت اتصال یابند، و به اصطلاح مستقل از اتصال<sup>۳</sup> هستند. از طرف دیگر این یاخته‌ها فاقد ویژگی توقف رشد در اثر تماس می‌باشند و در نتیجه در کشت معلق می‌توانند با یکدیگر برخورد کنند بدون اینکه تأثیری در رشدشان داشته باشد (۳).

با کشت معلق این یاخته‌ها در فلاسکهای چند لیتری کشت یاخته یا فرمانتورهای با گنجایش بالا می‌توان ضمن صرفه جویی فوق‌العاده در مصرف ظروف کشت یاخته، وقت، هزینه، نیروی انسانی و مکان به مقدار دلخواه اقدام به تولید ویروسهای دلخواه نمود (۴، ۵، ۶، ۷).

در این پژوهش تلاش شد تا با تعیین شرایط مناسب برای کشت یاخته‌ها شناور هلا، حساسیت و توان این یاخته‌ها نیز برای تکثیر دادن ویروسهای پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و آدنوویروس تیپ ۵ مورد ارزشیابی قرار گیرد. ضمناً نتایج حاصل از تکثیر ویروسهای فوق در یاخته‌های شناور هلا با آنچه که از تکثیر همین ویروسها در یاخته‌های تک لایه به دست آمد مقایسه شد (۸، ۹).

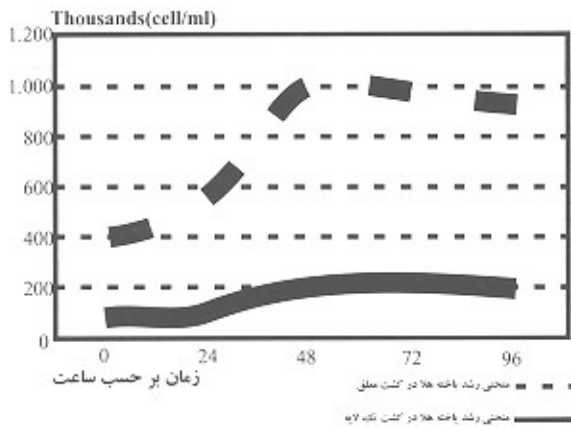
## مواد و روشها

### \* کشت یاخته‌های هلا

منشاء یاخته‌های هلا که در دنیا مصرف می‌شود از کارسینوما سرویکس رحم انسان است و کشت تک لایه آن از نظر ریخت‌شناسی به یاخته‌های اپیتلیال شبیه است (۱۰). یاخته‌هایی که در این پژوهش به کار گرفته شد، معمولاً متصل به سطح ظرف کشت یاخته رشد و تکثیر می‌یابند. برای تأمین مواد مورد نیاز این یاخته‌ها از محیط غذایی MEM حاوی ۵ درصد سرم استریل گوساله، که ۳۰ دقیقه تحت دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفته بود، استفاده شد. برای پیشگیری از رشد باکتریها مخلوطی از ۳ آنتی‌بیوتیک ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین G، ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین، و ۵۰ میکروگرم کانامایسین برای هر میلی لیتر از محیط کشت به آن افزوده شد. برای سترون کردن تمام مواد فوق از فیلتر ۰/۲ میکرون استفاده و روش کار به گونه‌ای طراحی شد که نیاز به افزودن مواد ضد قارچ به محیط کشت یاخته‌ها نباشد. یاخته‌های کشت داده شده تک لایه‌ای در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و PH برابر  $7/2-7/8$  نگهداری می‌شد. برای جداسازی و انتقال یاخته‌ها از ظرف کشت یاخته به ظروف جدید از محلول تریپسین ۲/۵ در هزار استفاده شد. ضمن تکرار این عمل غلظت بذر یاخته‌ها<sup>۱</sup> برای شروع کشت،

- |                            |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| 1. Primary Cell Culture    | 6. Spinner Culture Flasks    |
| 2. Transformed Cell        | 7. Erythrosine B             |
| 3. Anchorage Independent   | 8. Phosphate Buffered Saline |
| 4. Seeding Ratio           | 9. Cytopathic Effect         |
| 5. Suspension Cell Culture | 10. Karber                   |

با بررسی تاثیر سایر عوامل موجود در محیط کشت MEM مشخص شد بهترین شرایط برای رشد و تکثیر ساخته‌ها به این شرح می‌باشد:  
 تعداد ساخته‌ها برای شروع تکثیر، یعنی  $5 \times 10^5 - 3$  وجود تریپتوز فسفات، HEPES و سرم استریل و حرارت دیده گوساله، با مقادیری که در مواد و روشها ذکر شده است (جدول ۱ و نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه منحنی رشد ساخته‌های هلا در کشت شناور معلق و نند لایه

### \* مقایسه لازم برای دو برابر شدن ساخته‌ها در کشت یک لایه و کشت شناور

یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که زمان و منحنی دو برابر شدن ساخته‌ها در دو سیستم یک لایه و شناور کاملاً شبیه یکدیگر است. پس از ۴۸ ساعت تعداد ساخته‌ها در هر دو سیستم به  $2/5$  برابر افزایش یافت و سپس تا ۴۸ ساعت دیگر به صورت ثابت باقی ماند و پس از آن رو به کاهش نهاد.

### \* یافته‌های به دست آمده از تکثیر تیپهای ۱، ۲، ۳ ویروس پولیو و ویروس آدنوتیپ ۵ در سیستم کشت یک لایه و شناور ساخته‌های هلا

این یافته‌ها نشان داد که ساخته‌های شناور نیز بستر بسیار مناسبی برای رشد و تکثیر ویروسهای پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و ویروس آدنوتیپ ۵ هستند. مقایسه عیار ویروسهای به دست آمده در این دو سیستم نشان داد که برای زیاد کردن این ویروسها و تولید آنتی ژنهای مورد نیاز می‌توان با اطمینان از ساخته‌های شناور هلا بهره گرفت (جدول ۲).

### \* تلقیح ساخته‌های شناور هلا با تیپهای سه گانه ویروس پولیو

هر کدام از تیپهای ۱، ۲، ۳ ویروس پولیو که عیار دقیق آن تعیین شده بود به طور جداگانه به یک ظرف دارای کشت ساخته‌های شناور هلا تلقیح شد. تعداد ساخته‌های موجود در هر میلی لیتر محیط کشت برای  $7 \times 10^5$  بودند که با مقداری از ویروس که معادل  $MOI=2$  بود و میزان چرخش  $10^5$  بار در دقیقه تلقیح شدند. از ساخته‌ها فوق‌الذکر هر ۱۲ ساعت یک بار نمونه‌گیری شده و در فریز  $-70^{\circ}C$  درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

### \* بررسی حساسیت ساخته‌های شناور هلا به ویروس آدنوتیپ ۵

برای تعیین حساسیت ساخته‌های شناور هلا و بررسی توان آنها برای تکثیر ویروس آدنوتیپ ۵، از همان روشی که در مورد ویروسهای پولیو شرح داده شد استفاده گردید.

### یافته‌ها

در این پژوهش ابتدا سعی شد تا بایه وجود آوردن شرایط مطلوب، ساخته‌های هلا به صورت شناور کشت داده شوند. پس از چند بار تکرار مشخص شد محیط کشت MEM برای رشد و تکثیر ساخته‌های شناور هلا بهتر از محیطهای BME و ۱۹۹ است. برای جلوگیری از اتصال ساخته‌ها به یکدیگر لازم بود تا غلظت کلسیم موجود در محیط کاهش داده شود. این کار با افزودن EDTA به محیط کشت انجام شد و مقدار کلسیم با بهره‌گیری از دستگاه Atomic Absorption به منظور اندازه‌گیری میزان کلسیم، از  $256/0$  گرم در یک لیتر محیط به  $0/07$  گرم کاهش داده شد که نتیجه بسیار خوبی داشت، زیرا تعداد ساخته‌های شناور زنده در محیط فوق پس از ۲۴ ساعت رو به افزایش نهاد و ۴۸ ساعت پس از شروع کشت به بیش از دو برابر رسید. مرحله تکثیر لگاریتمی ساخته‌ها تا ۷۲ ساعت بعد از شروع کشت ادامه داشت، سپس تا ۲۴ ساعت تعداد ساخته‌ها تغییر قابل توجهی نشان نداد و بعد از آن به سرعت تعداد ساخته‌های مرده افزایش یافت و از تعداد ساخته‌های زنده کم شد.

تاثیر CMC بر تکثیر ساخته‌های هلا مورد بررسی قرار گرفت و یافته‌ها نشان داد که این ماده علاوه بر اینکه کمکی به تکثیر ساخته‌ها نمی‌کند بلکه از ازدیادشان نیز پیشگیری می‌کند.

جدول ۱: تاثیر عوامل کوناگون فیزیکی و شیمیایی بر تکثیر ساخته‌های معلق هلا

طول دوره کشت مطلق (ساعت)	تاثیر CMC بر تکثیر ساخته‌ها	تاثیر غلظت کاهش یافته کلسیم بر تکثیر ساخته‌ها	تاثیر HEPES بر تکثیر ساخته‌ها	تاثیر محیط کشت مطلوب بر تکثیر ساخته‌ها
۰	$3 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^5$
۲۴	$10^5$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
۴۸	$10^5$	$9 \times 10^5$	$8 \times 10^5$	$10^5$
۷۲	$10^5$	$10 \times 10^5$	$10^5$	$9/5 \times 10^5$
۹۶	$10^5$	$9/5 \times 10^5$	$10^5$	$9 \times 10^5$

جدول ۲: مقایسه MOI ویروسها پولیوتیپ ۱، ۲ و ویروس امنو ۵ که در دو سیستم کشت باخته‌های هلا به دست آمده است

نوع ویروس	MOI اولیه ویروس که به کشت یک لایه تلقیح شده است	MOI به دست آمده از تکثیر ویروس در کشت یک لایه	MOI اولیه ویروس که به کشت شناور تلقیح شده است	MOI به دست آمده از تکثیر ویروس در کشت شناور
ویروس پولیوتیپ ۱	۲	۱۲	۲	۱۵
ویروس پولیوتیپ ۱	۲	۹	۲	۱۴
ویروس پولیوتیپ ۳	۲	۱۲	۲	۱۵
ویروس امنوتیپ ۵	۲	۹	۲	*

## بحث

نداشت. برای حفظ بهتر PH محیط، و با توجه به اینکه ظرف حاوی کشت باخته‌های شناور هلا در گرمخانه فاقد CO<sub>2</sub> نگهداری می‌شد، از بافر HEPES به جای بافر بی‌کربنات استفاده شد که نتیجه بهتری به دست آمد (۱۶).

چون یون کلسیم باعث اتصال باخته‌ها به یکدیگر می‌شود بنابراین در حضور غلظت بالای این یون نتیجه مطلوبی از کشت‌های شناور به دست نخواهد آمد. در این پژوهش با افزودن EDTA به محیط کشت، غلظت یون کلسیم از ۰/۲۵۶ به ۰/۰۷ گرم در لیتر کاهش داده شد که نتیجه آن تکثیر باخته‌های شناور هلا به صورت مثبت بود.

یکی از عوامل مهم که باعث یکنواخت شدن باخته‌های شناور در کشت خواهد شد سرعت به هم زدن محیط کشت است (۱۷). در این پژوهش سرعت چرخاندن محیط کشت حاوی باخته‌های شناور ۷۰ دور در دقیقه که نتیجه مطلوبی در برداشت.

پس از دست یابی به شرایط مطلوب برای رشد و تکثیر باخته‌های شناور، زمان دو برابر شدن و مرحله لگاریتمی تکثیر آنها با کشت باخته‌های یک لایه هلا مقایسه شد که اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان نداد.

از باخته‌های هلا که در این پژوهش به صورت شناور کشت داده شد برای تکثیر ویروس‌های پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و ویروس آدنوتیپ ۵ استفاده شد. از باخته‌های یک لایه هلا نیز به عنوان شاهد استفاده و ویروس‌های فوق در آنها تکثیر داده شد.

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که با بهره‌گیری از مواد و شرایطی که در بخش مواد و روشها ذکر شد می‌توان باخته‌های هلا را به صورت شناور شد و تکثیر داد، و توانایی این باخته‌ها برای تکثیر ویروس‌های پولیوتیپ ۱، ۲ و ۳ آدنوتیپ ۵ مشابه باخته‌های یک لایه هلا است.

کشت باخته‌های جانوری از روشهایی است که امروزه در مراکز پژوهشی مربوط به زیست سلولی - مولکولی، بیوتکنولوژی، تولید آنتی ژنها و واکسنهای ویروسی و تشخیص عوامل ویروسی بیماری‌زا کاربرد وسیعی دارد (۱۲).

با توجه به اینکه ویروسها انگل اجباری باخته‌های زنده هستند (۱۳). بنابراین استفاده از کشت باخته‌ها از جمله روشهای مرسوم در مراکز ویروس‌شناسی است. برای تولید آنتی‌ژنهای ویروسی، تشخیص عوامل بیماری‌زایی ویروسی، و تولید واکسنهای دارای ویروسهای غیر فعال که در دامپزشکی مصرف وسیع دارد می‌توان از باخته‌های پایدار تغییر شکل یافته استفاده کرد. از جمله مهمترین روشهایی که به کمک آن می‌توان به تولید انبوه باخته‌های تغییر شکل یافته اقدام کرد استفاده از کشت باخته‌های شناور است.

برای تولید باخته‌های شناور باید از باخته‌هایی استفاده کرد که احتیاج به لنگر اندازی برای رشد و تکثیر ندارند و فاقد پیشگیری در اثر تماس هستند. از جمله باخته‌هایی که دارای این ویژگیهاست و در آزمایشگاههای ویروس‌شناسی انسانی نیز کاربرد وسیعی دارد باخته‌های هلا است (۱۴).

در این پژوهش سعی شد برای اولین بار در ایران باخته‌های هلا به صورت شناور کشت شود. با بهره‌گیری از محیطهای مختلف کشت باخته و استفاده از عوامل متعدد که به محیط کشت اضافه شد، شرایط مطلوب برای تکثیر این باخته به صورت شناور شناسایی و به کار گرفته شد.

از بین سه محیط کشت، یعنی EBEM، MEM و EBEM، محیط کشت MEM برای رشد تکثیر باخته‌های هلا بهترین نتیجه را در برداشت. برای حذف کاتیونهایی که باعث اتصال باخته‌ها به یکدیگر می‌شوند، به محیط کشت باخته‌های معلق CMC اضافه شد (۱۵)، ولی نتیجه مطلوبی

۲۶

## References

- Morgan SJ, Darling DC: Primary culture. In animal cell culture, SJ Morgan, DC Darling (eds). BIOS scientific publishers, Oxford, UK, 1993, PP 37-50 & 51-65
- Menegus MA: Diagnostic virology. In textbook of human virology, RB Belshe (2nd ed). Mosby Year Book, Philadelphia, 1991, PP 156-166
- Lewin B: Oncogenes and cancer. In genes VI, L Benjamin (6th ed). Oxford University Press, Oxford, 1996, PP 1131-1172
- Nardelli L, Panina GF: The use of suspension culture for FMD vaccine production, criteria for the evaluation of cells, virus and vaccine. International symposium on foot - and - mouth disease. Develop. biol. Standard (35 th ed). S. Karger, Basel, 1997, PP 9-25
- Gurhan: The application of large scale cell and virus

Production technology at FMD institute, Ankara. First international FMD symposium. Ankara, Turkey, 1989, PP 89-100

6. Bartelling SJ, Vreeswijk: Developments in foot - and - mouth disease vaccines. Vaccines, 1991, 9: 75-88

7. Griffiths B: Scaling - up of animal cell culture. In animal cell culture, RI Freshney (2 nd ed). IRL Press, Oxford, 1992, PP 47-93

8. McIntosh K: Diagnostic virology. In Fields virology, BN Fields (3 rd ed). Lippincott - Raven, Philadelphia, 1996, PP, PP 665-712

9. Melnick JL: Enteroviruses. In Fields virology, BN Fields (3 rd ed). Lippincott- Raven, Philadelphia, 1996, PP 401-430

10. Blake K: Cell culture. In virology labfax, DR Harper (eds). Bios Scientific Publishers, Blackwell, 1993. pp 51-79

11. Grist NR, Bell EJ, Follett EAC, Urquhart GED: Indlagnostic methods in clinical virology, NR Grist, EJ Bell, EAC Follett, GED Urquhart (3 rd ed). Blackwell Scientific publications, Oxford, 1979. PP 81-94

12. Freshney RI: Introduction to Basic Principles. In

animal cell culture , RI Freshney (2 nd ed). IRL Press,Oxford, 1992, pp 1-14

13. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Sluddert MJ: Virus-cell interactions. In veterinary virology, FA Murphy, EPJ Gibbs, MC Horzinek, MJ Sluddert (3 rd ed). Academic press, London, 1999, PP 81-92

14. Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J: Manipulating cells and viruses in culture. In molecular cell biology, H Lodish, D Baltimore, A Berk, SL Zipursky, P Matsudaira, J Darnell (3 rd ed). Scientific American Books, New York, 1995, PP 189-220

15. Stryer L: Exploring proteins. In biochemistry, L. Stryer, (4th ed). W. H. Freeman and Company, New York, 1995, pp 45-74

16. Freshney RI: The culture environment: II. Media and supplements. In culture of animal cells, RI Freshney, (eds) Alan R. Liss, Inc., New York, 1983, pp 67-97

17. Doyle A, Griffiths JB: Spinner flask culture. In cell and tissue culture. Laboratory procedue in biotechnology, A Doyle, JB Griffiths (eds). John Wiley & Sons, New York, 1998, PP 231-234

