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 ترتبیت مدرس، گروه ویروس شناسی

چکیده

* **هدف:** راه اندازی کشت یاخته‌های هلا به منظور تولید آنتی‌ژنهای 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 Minimum Essential Medium (MEM)که حاوی ده درصد سرم استریل گوساله 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 تراستیک 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.

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

مقدمه

کشت یاخته‌ها اولیه[1]، و یاخته‌ها تغییر شکل یافته[2] 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[3] 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 تاثیری 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 کارسینومای 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 تامین 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 میکرو گرم 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 ۷/۲-۶/۸ 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[4] برای شروع کشت، 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[5]

برای کشت یاخته‌های هلا به صورت شناور از ظروف کشت شبیه به اسپینر[6] 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 ثابتی از یاخته‌ها برداشت و با استفاده از محلول یک در هزار اریتروزین B[7] در PBS[8] و PH برابر با ۷/۴-۷/۲ رنگ‌آمیزی و شمارش شد.

* عوامل موثر در کشت شناور

مواد مختلفی به کشت یاخته‌های شناور اضافه شد تا تاثیرشان 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 ۰/۰۰۵ گرم در یک میلی لیتر محیط، و تریپتوز فسفات براث به مقدار ۰/۰۰۳ گرم در هر میلی لیتر محیط کشت یاخته‌ها بود.

* آماده سازی بذرهای ویروس پولیوتیپ ۱، ۲، ۳

از بذر تیپهای ۱، ۲، ۳ ویروس ضعیف شده پولیو (تیپهای 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 ۳۷درجه سانتیگراد انتقال داده شد. پس از بروز آثار کامل بیماری زایی (CPE)[9] 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 جمع‌آوری ویروسها در آخرین پاساژ، عیار هر تیپ با استفاده از روش کاربر[10] تعیین شد (۱۱).

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

* تلقیح یاخته‌های 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 یاخته‌های شناور هلا تلقیح شد. تعداد یاخته‌های موجود در هر میلی لیتر محیط کشت برای ۷×۱۰^{۵} بودند که با مقداری از ویروس که معادل MOI=۲ بود و میزان چرخش ۱۰۰ بار در دقیقه تلقیح شدند. از یاخته‌ها فوق‌الذکر هر ۱۲ ساعت یک بار نمونه‌گیری شده و در فریز ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

* بررسی حساسیت یاخته‌های شناور هلا به ویروس آدنوتیپ ۵

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

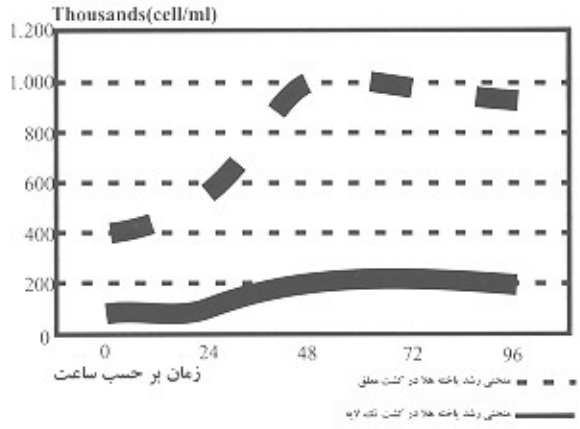
یافته‌ها

در این پژوهش ابتدا سعی شد تا با به وجود آوردن شرایط مطلوب، یاخته‌های هلا به صورت شناور کشت داده شوند. پس از چند بار تکرار مشخص شد محیط کشت MEM برای رشد و تکثیر یاخته‌های شناور هلا بهتر از محیطهای BME و ۱۹۹ است. برای جلوگیری از اتصال یاخته‌ها 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 ۰/۲۵۶ گرم در یک لیتر محیط به ۰/۰۷ گرم کاهش داده شد که نتیجه بسیار خوبی داشت، زیرا تعداد یاخته‌های 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. مرحلهٔ تکثیر لگاریتمی یاخته‌ها تا ۷۲ ساعت بعد از شروع کشت ادامه داشت، سپس تا ۲۴ ساعت تعداد یاخته‌ها تغییر قابل توجهی نشان نداد و بعد از آن به سرعت تعداد یاخته‌های مرده افزایش یافت و از تعداد یاخته‌های زنده کم شد.

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

با بررسی تاثیر سایر عوامل موجود در محیط کشت MEM مشخص شد بهترین شرایط برای رشد و تکثیر یاخته‌ها به این شرح می‌باشد:

تعداد یاخته‌ها برای شروع تکثیر، یعنی ۵×۱۰^{۵}-۳ 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 یاخته‌های هلا در کشت شناور معلق و تک لایه

* مقایسه لازم برای دو برابر شدن یاخته‌ها در کشت یک لایه و کشت شناور

یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که زمان و منحنی دو برابر شدن یاخته‌ها در دو سیستم یک لایه و شناور کاملاً شبیه یکدیگر است. پس از ۴۸ ساعت تعداد یاخته‌ها در هر دو سیستم به ۲/۵ 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 یاخته‌های هلا

این یافته‌ها نشان داد که یاخته‌های 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 یاخته‌های شناور هلا بهره گرفت (جدول ۲).

جدول ۱: تاثیر عوامل گوناگون فیزیکی و شیمیایی بر تکثیر یاخته‌های معلق هلا

طول دوره کشت مطلق (ساعت)	تاثیر CMC بر تکثیر یاخته‌ها	تاثیر غلظت کاهش یافته کلسیم بر تکثیر یاخته‌ها	تاثیرHEPES بر تکثیر یاخته‌ها	تاثیر محیط‌کشت مطلوب بر تکثیر یاخته‌ها
۰	۳×۱۰^{۵}	۴×۱۰^{۵}	۴×۱۰^{۵}	۴×۱۰^{۵}
۲۴	$۱۰^{۵}$	۵×۱۰^{۵}	۵×۱۰^{۵}	۵×۱۰^{۵}
۴۸	$۱۰^{۶}$	۹×۱۰^{۵}	۸×۱۰^{۵}	$۱۰^{۶}$
۷۲	$۱۰^{۶}$	۱۰×۱۰^{۵}	$۱۰^{۵}$	$۹/۵\times۱۰^{۵}$
۹۶	$۱۰^{۶}$	$۹/۵\times۱۰^{۵}$	$۱۰^{۶}$	۹×۱۰^{۵}

جدول ۲: مقایسه MOI ویروسها پولیوتیپ ۱، ۲، ۳ و ویروس آدنو ۵ که در دو سیستم کشت یاخته‌های 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 ۲	۲	۹	۲	۱۲
ویروس پولیوتیپ ۳	۲	۱۲	۲	۱۵
ویروس آدنوتیپ ۵	۲	۹	۲	۴

بحث

کشت یاخته‌های 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 بیماری زاکاربرد وسیعی دارد (۱۲).

با توجه به اینکه ویروسها انگل اجباری یاخته‌های زنده هستند (۱۳). بنابراین استفاده از کشت یاخته‌ها 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 یاخته‌های پایدار تغییر شکل یافته استفاده کرد. از جمله مهمترین روشهایی که به کمک آن می‌توان به تولید انبوه یاخته‌های تغییر شکل یافته اقدام کرد استفاده از کشت یاخته‌های شناور است.

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

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

از بین سه محیط کشت، یعنی MEM، EBEM و ۱۹۹، محیط کشت MEM برای رشد تکثیر یاخته‌های هلا بهترین نتیجه را دربرداشت. برای حذف کاتیونهایی که باعث اتصال یاخته‌ها به یکدیگر می‌شوند، به محیط کشت یاخته‌های معلق CMC اضافه شد (۱۵)، ولی نتیجه مطلوبی نداشت. برای حفظ بهتر PH محیط، و با توجه به اینکه ظرف حاوی کشت یاخته‌های شناور هلا در گرمخانه فاقد CO_2 نگهداری می‌شد، از بافر HEPES به جای باقر بی‌کربنات استفاده شد که نتیجه بهتری به دست آمد (۱۶).

چون یون کلسیم باعث اتصال یاخته‌ها 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 درلیتر کاهش داده شد که نتیجه آن تکثیر یاخته‌های شناور هلا به صورت مثبت بود.

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

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

از یاخته‌های 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 یاخته‌های 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 بهره گیری از مواد و شرایطی که در بخش مواد و روشها ذکر شد می‌توان یاخته‌های هلا را به صورت شناور شد و تکثیر داد، و توانایی این یاخته‌ها برای تکثیر ویروسهای پولیوتیپ ۱، ۲ و ۳ آدنوتیپ ۵ مشابه یاخته‌های یک لایه هلا است.

References

1. 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

2. Menegus MA: Diagnostic virology. In textbook of human virology, RB Belshe (2nd ed). Mosby Year Book, Philadelphia , 1991, PP 156-166

3. Lewin B: Oncogenes and cancer. In genes VI, L Benjamin (6th ed). Oxford University Press, Oxford, 1996, PP 1131-1172

4. 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

5. 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 cuture, 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 Frenshney (2 nd ed). IRL Press,Oxford, 1992, pp 1-14
13. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horznek MC, Sluddert MJ: Virus-cell interactions. In veterinary virology, FA Murphy, EPJ Gilbbs, MC Horzined, MJ sluddert (3 rd ed). Academic press, London, 1999, PP 81-92
14. Lodish H, Baltimore D, Berd 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 Matsudaria, 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 enviroment: 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