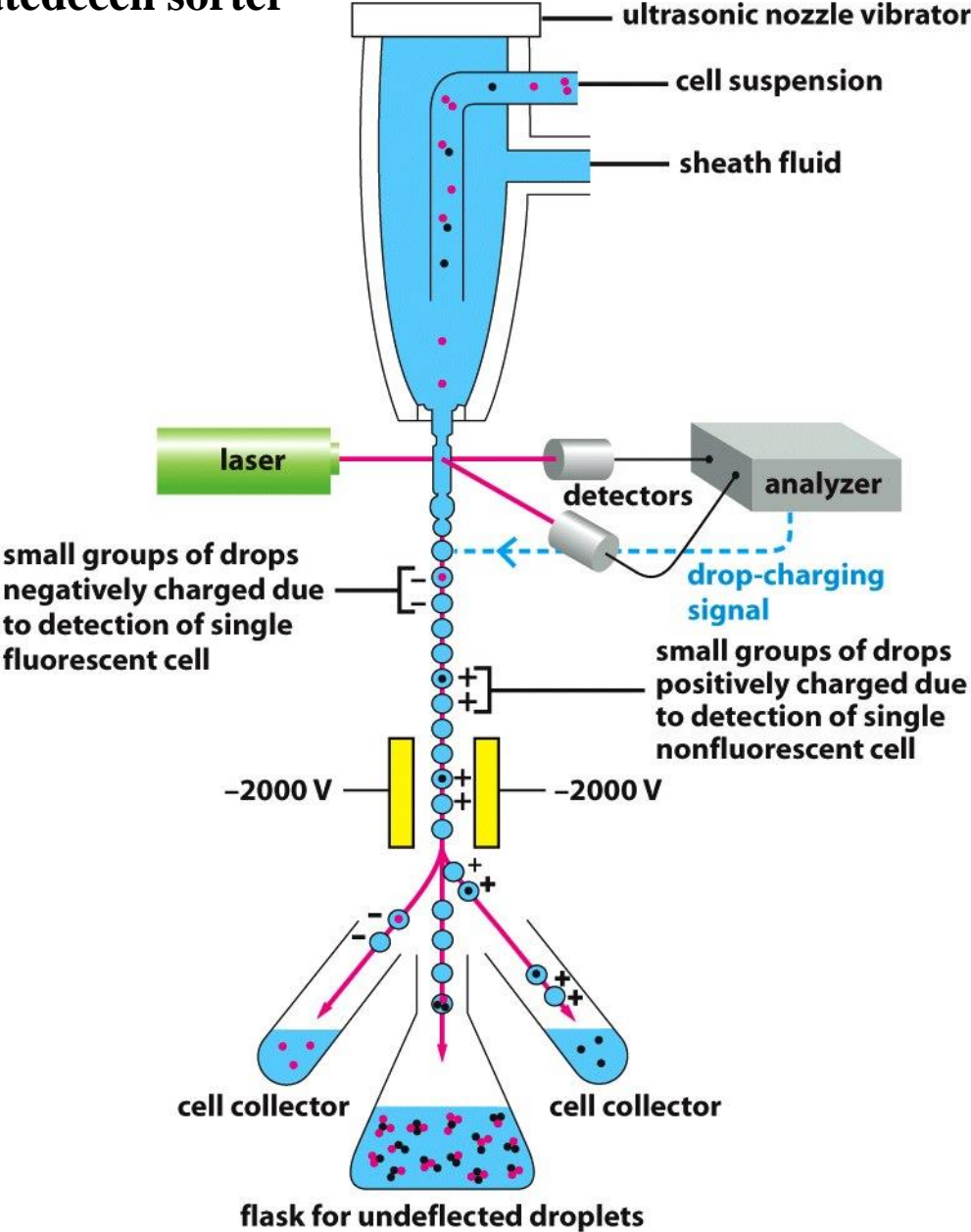


# Isolating Cells and Growing them in Cultures

# Fluorescence-activated cell sorter



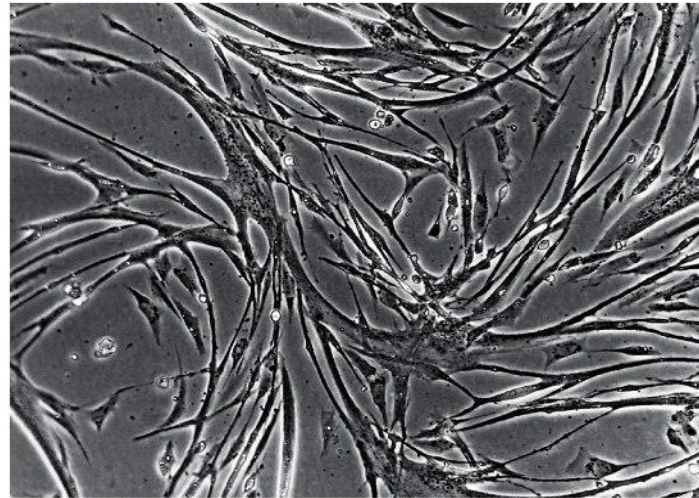
# انواع سلول

سلولهای حیوانی معمولا توسط بافتی که از آن مشتق می شوند، شناخته می شود و اشکال مشخصی دارند که به راحتی توسط میکروسکوپ نوری قابل مشاهده و تشخیص هستند.



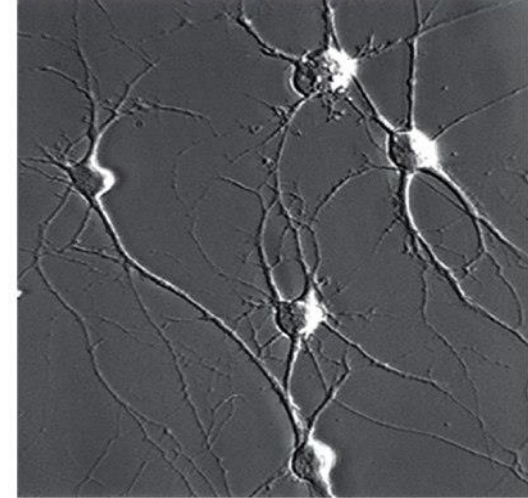
(A)

20  $\mu\text{m}$



(B)

100  $\mu\text{m}$



(C)

50  $\mu\text{m}$

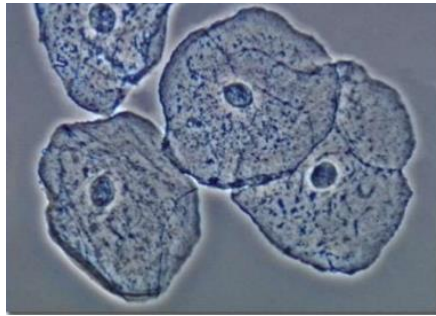


(D)

50  $\mu\text{m}$

## پنج نوع اصلی بافت حیوانی:

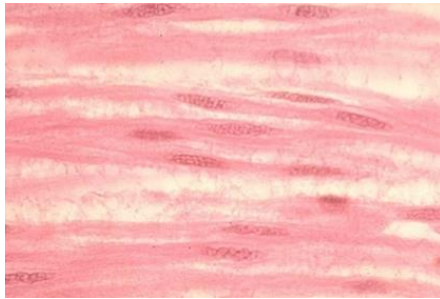
۱- بافت اپیتلیال مانند پوست و دستگاه گوارش



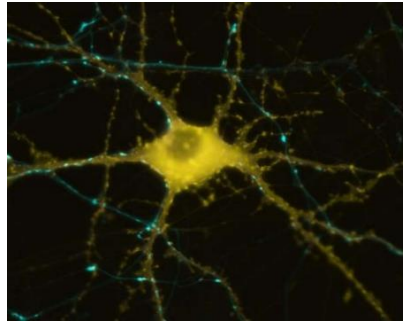
۲- بافت همبند شامل ماتریکس فیبری و غضروف استخوانی  
مانند فیرو بلاست



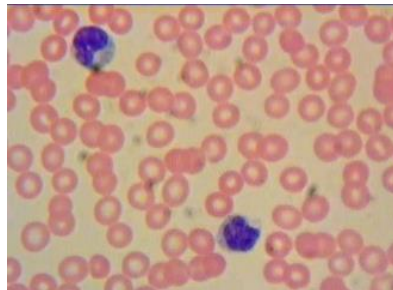
۳- بافت ماهیچه مانند میوبلاست ها و فرایند تمایز آنها در محیط کشت



۴- بافت عصبی



۵- خون و لنف مانند لنفوبلاست ها





رده سلولی: جمعیتی از سلول ها که می توانند بعد از پاساژهای متعدد به رشد خود ادامه دهند

**Table 8–1 Some Commonly Used Cell Lines**

| <b>CELL LINE*</b> | <b>CELL TYPE AND ORIGIN</b>                                       |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>3T3</b>        | <b>fibroblast (mouse)</b>                                         |
| <b>BHK21</b>      | <b>fibroblast (Syrian hamster)</b>                                |
| <b>MDCK</b>       | <b>epithelial cell (dog)</b>                                      |
| <b>HeLa</b>       | <b>epithelial cell (human)</b>                                    |
| <b>PtK1</b>       | <b>epithelial cell (rat kangaroo)</b>                             |
| <b>L6</b>         | <b>myoblast (rat)</b>                                             |
| <b>PC12</b>       | <b>chromaffin cell (rat)</b>                                      |
| <b>SP2</b>        | <b>plasma cell (mouse)</b>                                        |
| <b>COS</b>        | <b>kidney (monkey)</b>                                            |
| <b>293</b>        | <b>kidney (human); transformed with adenovirus</b>                |
| <b>CHO</b>        | <b>ovary (Chinese hamster)</b>                                    |
| <b>DT40</b>       | <b>lymphoma cell for efficient targeted recombination (chick)</b> |
| <b>R1</b>         | <b>embryonic stem cell (mouse)</b>                                |
| <b>E14.1</b>      | <b>embryonic stem cell (mouse)</b>                                |
| <b>H1, H9</b>     | <b>embryonic stem cell (human)</b>                                |
| <b>S2</b>         | <b>macrophage-like cell (<i>Drosophila</i>)</b>                   |
| <b>BY2</b>        | <b>undifferentiated meristematic cell (tobacco)</b>               |

**\*Many of these cell lines were derived from tumors. All of them are capable of indefinite replication in culture and express at least some of the special characteristics of their cell's of origin.**

چگونگی انتخاب یک نوع سلول خاص؟

□ به سلول ها اجازه رشد بدهیم مانند: fibroblast overgrowth

□ کنترل ترکیب محیط رشد

□ جدا کردن سلول ها با استفاده از density gradient centrifugation

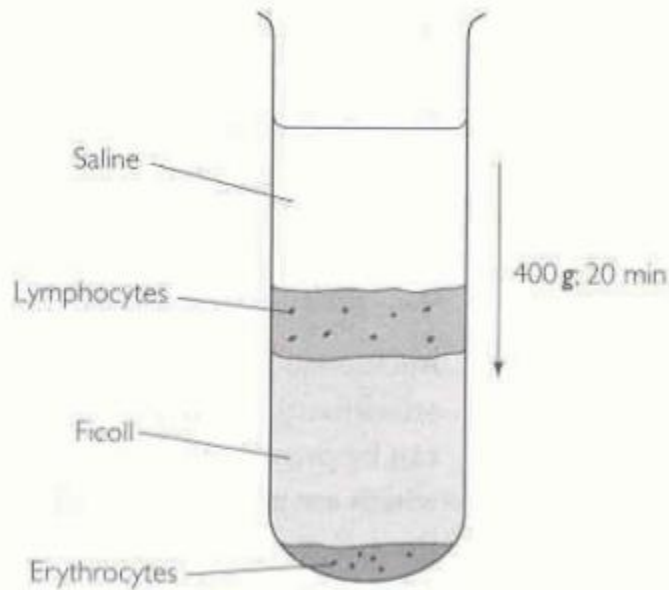


Figure 2.4

*Separation of cells by density gradient centrifugation.*

# یک سلول طبیعی چه خصوصیاتى دارد؟

تعداد کروموزوم دیپلوئید

وابستگی به تکیه گاه

یک دوره زندگی محدود

خوش خیمی

# کشت سلول های تمایز یافته

تمایز فرایندی است که بوسیله آن، سلول ها به آهستگی ویژگی های خود را تغییر می دهند تا به سلول های تخصص یافته همراه با فنوتیپی ویژه تبدیل شوند.

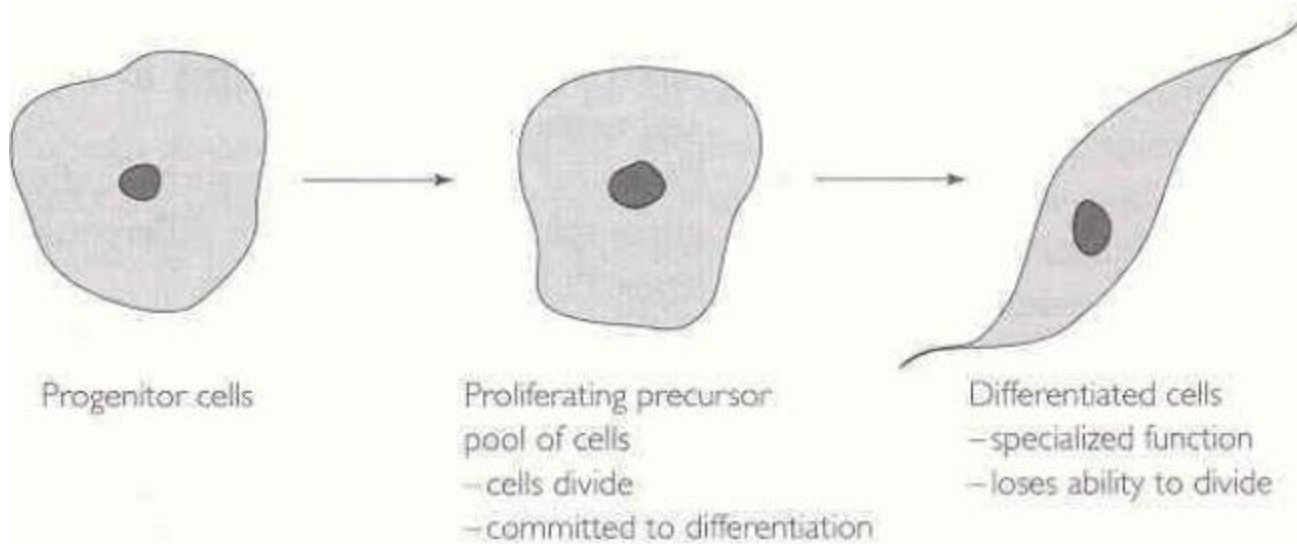


Figure 2.6

Cell differentiation.

ناسازگاری تکثیر با بیان خصوصیات تمایزی



# فاکتورهای دخیل در حفظ خصوصیات تمایزی سلول های طبیعی در محیط کشت:

□ هورمون ها و فاکتورهای رشد

□ عوامل شیمیایی مانند DMSO

□ واکنش های متقابل سلولی: اتصالات شکاف دار

□ واکنش های متقابل با سطح رشد: کلاژن و قطبیت هیپاتوسیت ها

# سلول های بنیادی جنینی

pluripotent

چند استعدادی یا چند ظرفیتی

تکثیر نامحدود در حالت تمایز نیافته

تمایز جهت دار

بیان مارکرهای اختصاصی: Oct4، SSEA (Stage-Specific Embryonic antigen)

کاریوتیپ دیپلوئید طبیعی

فعالیت بالای تلومراز

تشکیل تراتوما در موش ایمنوساپرس شده

# سلول های بنیادی بالغ

multipotent

سلول های تمایز نیافته در لابه لای سلول های تمایز یافته در یک بافت یا ارگان

نسبت به سلول های بنیادی جنینی مسیر تمایزی محدودتری دارند

در جایگزینی سلول های از دست رفته یا ترمیم آسیب بافتی کاربرد دارند

ممکن است تحت شرایط خاصی به انواع سلول های دیگر غیر از سلول های موجود در بافتی که از آن مشتق شده اند تبدیل شوند که به آن *transdifferentiation* یا *plasticity* گفته می شود.

# سلول های بنیادی مغز استخوان از مسیر هماتوپویتیک تمایز می یابند و در جایگزینی مداوم سلول های خونی نقش دارند.

مراحل هماتوپویزیس توسط محیط اطراف سلول ها و پروتئین های ترشحی (سیتوکین ها) از سلول های مجاور (سلول های استرومایی) کنترل می شوند.

20 Animal cell culture and technology

CFU-GMP = colony-forming unit-granulocyte-erythroid macrophage megakaryocyte  
CFU-Meg = colony-forming unit-megakaryocyte  
BFU-E = burst-forming unit-erythroid  
CFU-E = colony-forming unit-erythroid  
CFU-Eo = colony-forming unit-eosinophil  
CFU-Blast = colony-forming unit-blast

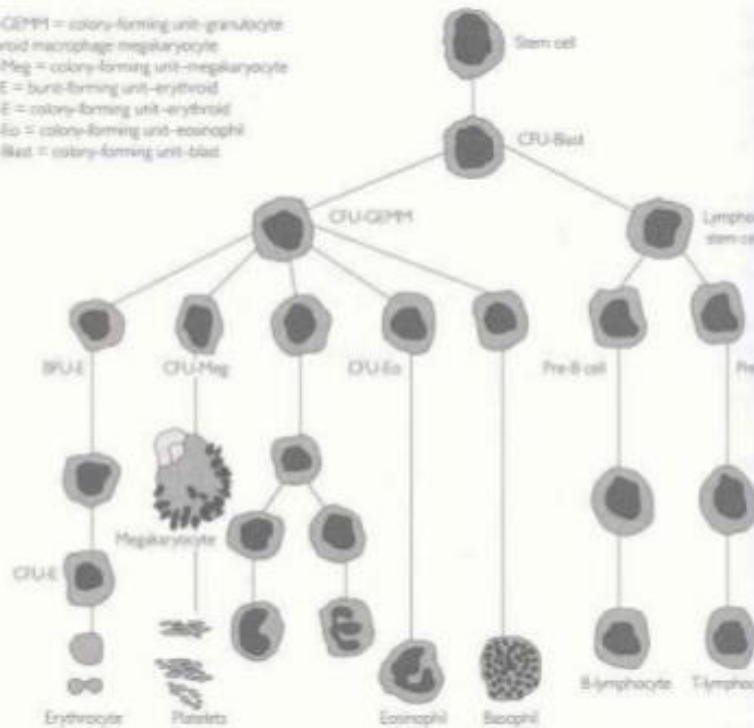


Figure 2.7

Differentiation of cells of the hematopoietic system. Modified from Inoue, et al., 1995.

## سلول های تغییر شکل یافته (transformes cells)

□ قدرت رشد نامحدود

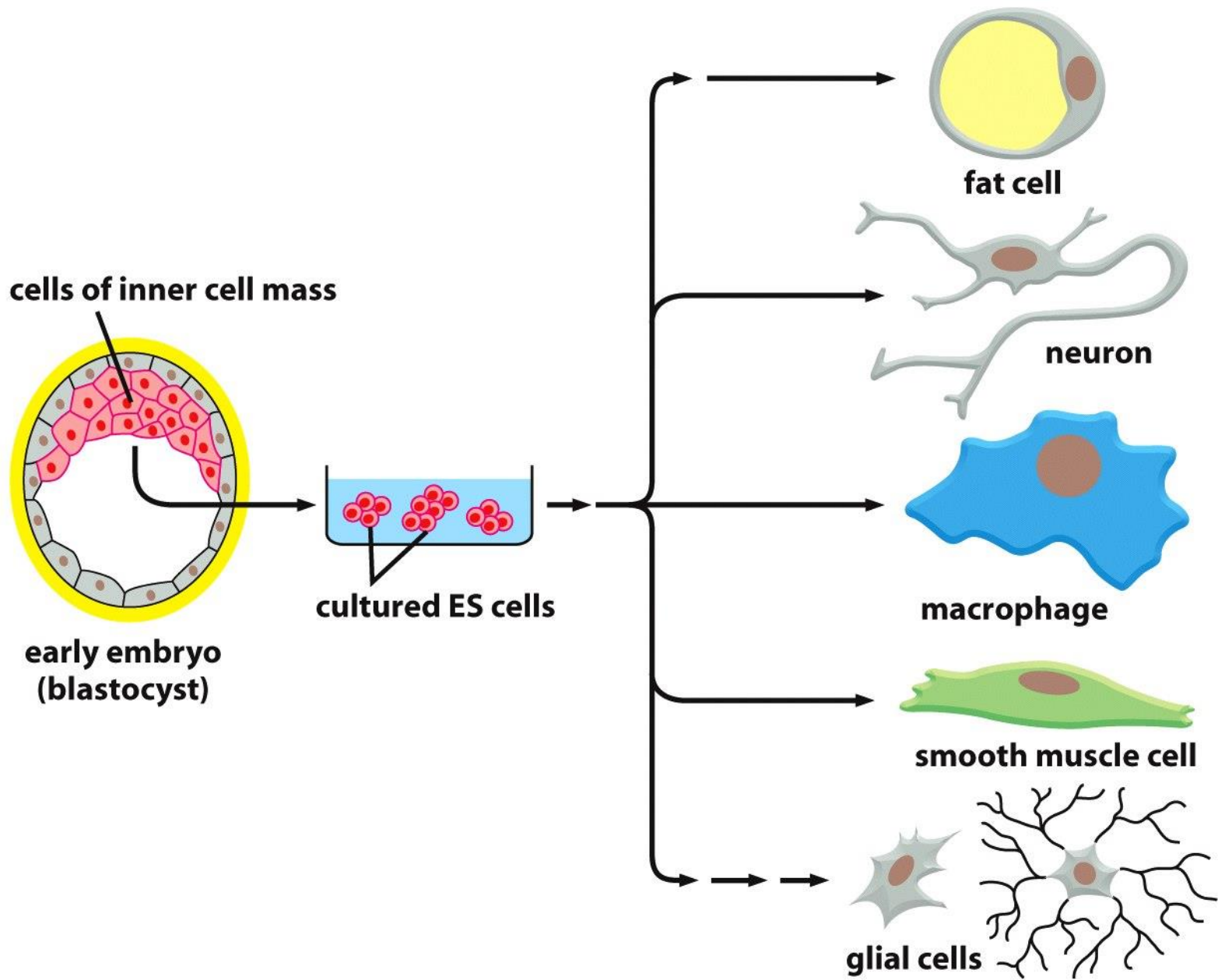
□ از دست دادن وابستگی به تکیه گاه

□ قطعه قطعه شدن کروموزومی (aneuploidy)

□ ظرفیت بالای رشد در محیط کشت ساده، بدون نیاز به فاکتورهای رشد

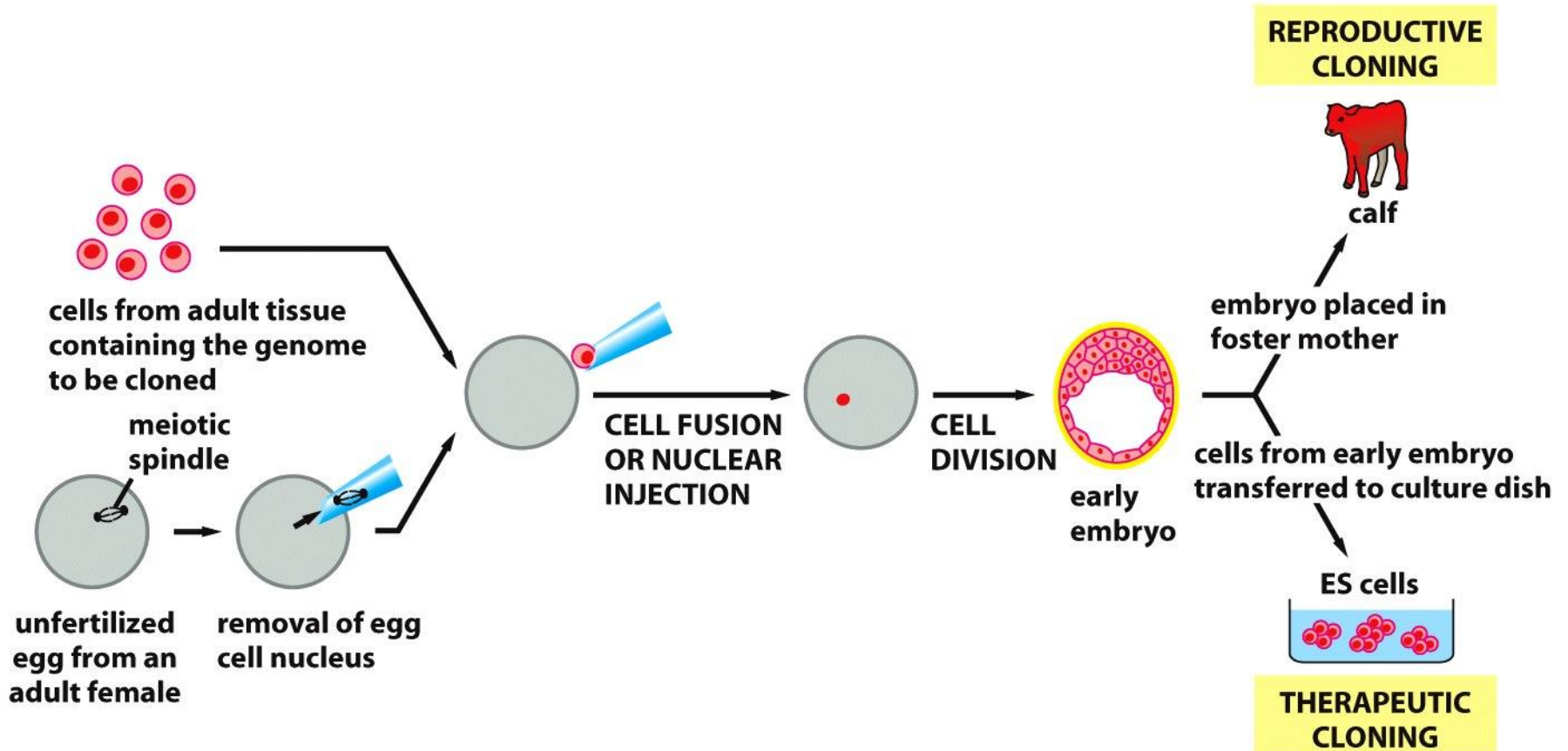
□ رده سلولی متداوم (continuous) خوانده می شوند مانند سلول های HeLa و سلول های  
Namalwa

□ آلودگی به رترو ویروس های بیان کننده انکوژن ها مانند myc و ras یک روش موثر  
برای فنا ناپذیر کردن سلول ها

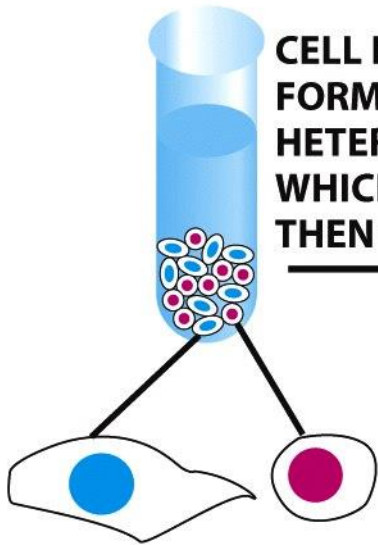




# Somatic cell nuclear transplantation



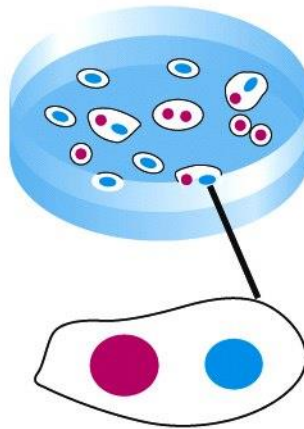
**SUSPENSION OF TWO CELL TYPES CENTRIFUGED WITH A FUSING AGENT ADDED**



**differentiated normal cell**

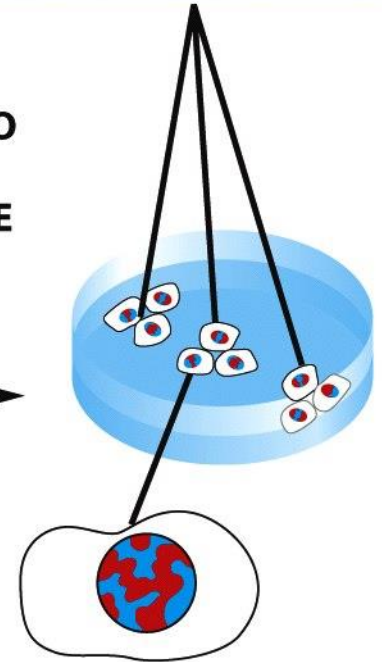
**mouse tumor cell**

**CELL FUSION AND FORMATION OF HETEROCARYONS, WHICH ARE THEN CULTURED**



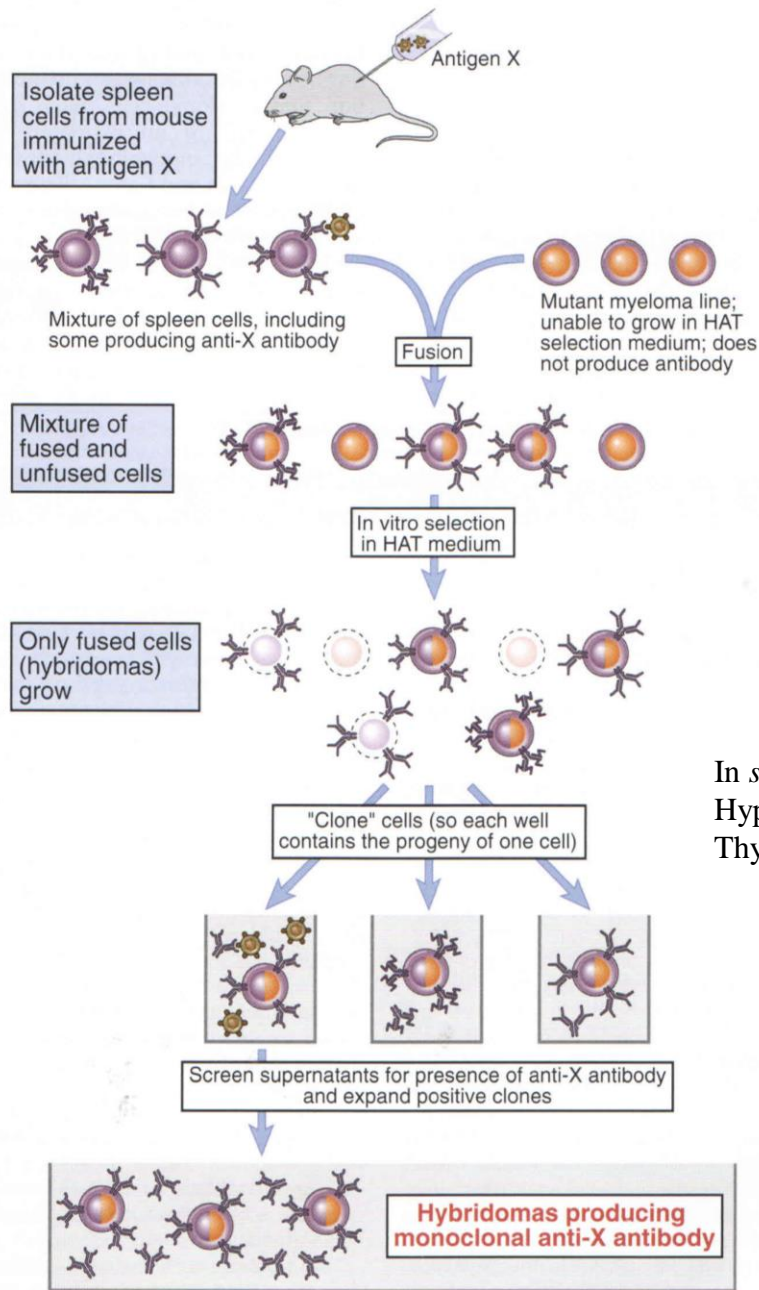
**heterocaryon**

**SELECTIVE MEDIUM ALLOWS ONLY HETEROCARYONS TO SURVIVE AND PROLIFERATE. THESE BECOME HYBRID CELLS, WHICH ARE THEN CLONED**



**hybrid cell**

**three clones of hybrid cells**



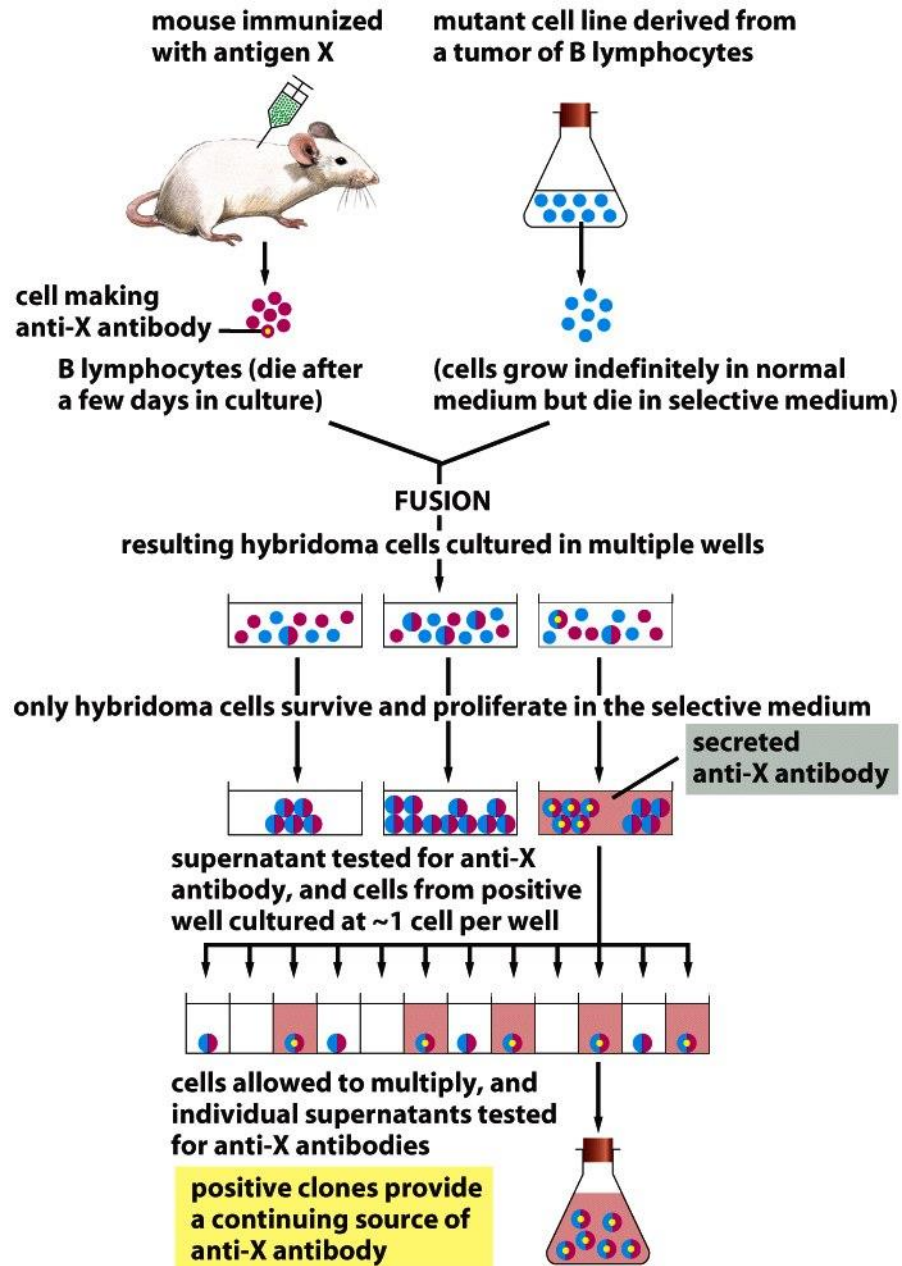
Myeloma cell line with defects in nucleotide synthesis pathway.

normal cells synthesize purine nucleotide by *de novo pathway*.

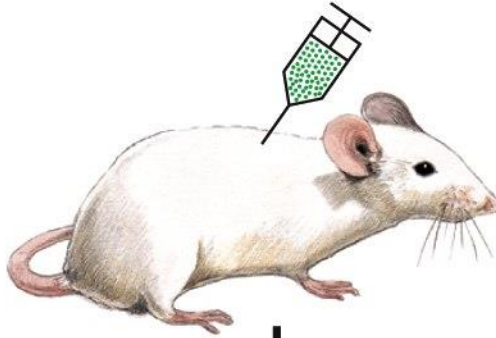
Aminopterin block activation of tetrahydrofolate.

Myeloma cell line with defects in nucleotide synthesis pathway.

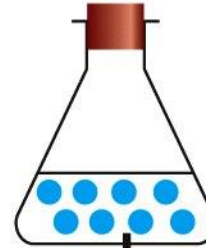
In *salvage pathway*, purine is synthesized from Hypoxanthine by HGPRT and thymidylate is synthesized from Thymidine by TK.



**mouse immunized  
with antigen X**



**mutant cell line derived from  
a tumor of B lymphocytes**



**cell making  
anti-X antibody**

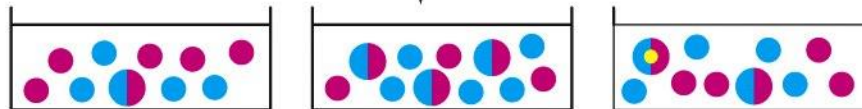


**B lymphocytes (die after  
a few days in culture)**

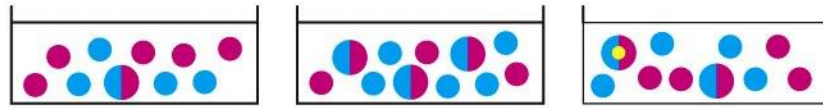
**(cells grow indefinitely in normal  
medium but die in selective medium)**

**FUSION**

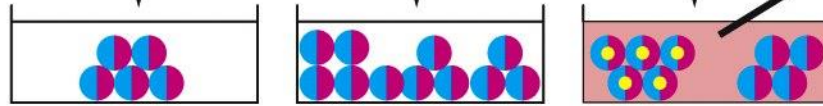
**resulting hybridoma cells cultured in multiple wells**





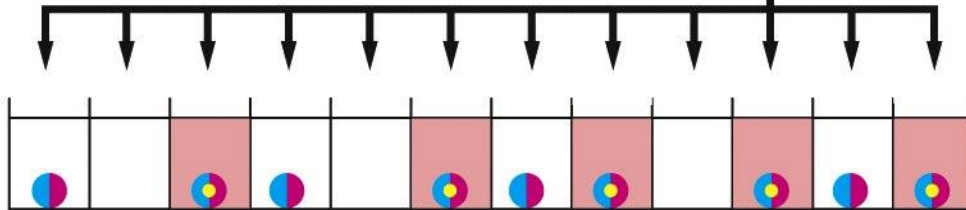


**only hybridoma cells survive and proliferate in the selective medium**



**secreted anti-X antibody**

**supernatant tested for anti-X antibody, and cells from positive well cultured at ~1 cell per well**



**cells allowed to multiply, and individual supernatants tested for anti-X antibodies**

**positive clones provide a continuing source of anti-X antibody**

