

# Genetika, zelulen, molekulen eta eboluzioaren biologiaren esparru barneko esperimentazioaren hastapena

## 3. Gaia: Proteina baten funtzioaren analisia baimentzen dituzten Zelulen Biologiako teknikak



- Entsegu funtzionalak burutzea baimentzen dizkiguten Zelulen Biologiako hainbat teknika daude.
- Gai honetan ikastaro honetan planteatu den esperimentaziorako bereziki baliagarriak diren hiru tresna zelular aurkeztuko ditugu:
  1. **"In vitro" hazkuntza:** Zelulen biologian oinarritzkoa eta funtsezkoa den teknika; konkretuki esperimentazio honetan ezarri diren helburuak burutzeko melanozitoen hazkuntza bereziki nabarmena da.
  2. **Immunohistokimika:** proteinen kokapen naturala zelularen barnean burutzea baimentzen du.
  3. Zelulek sintetizatutako produktuen **kuantifikazioa.** Ikerketa honetarako, **melaninaren** kuantifikazioa bereziki garrantzitsua da.



# 1. "In vitro" Hazkuntza

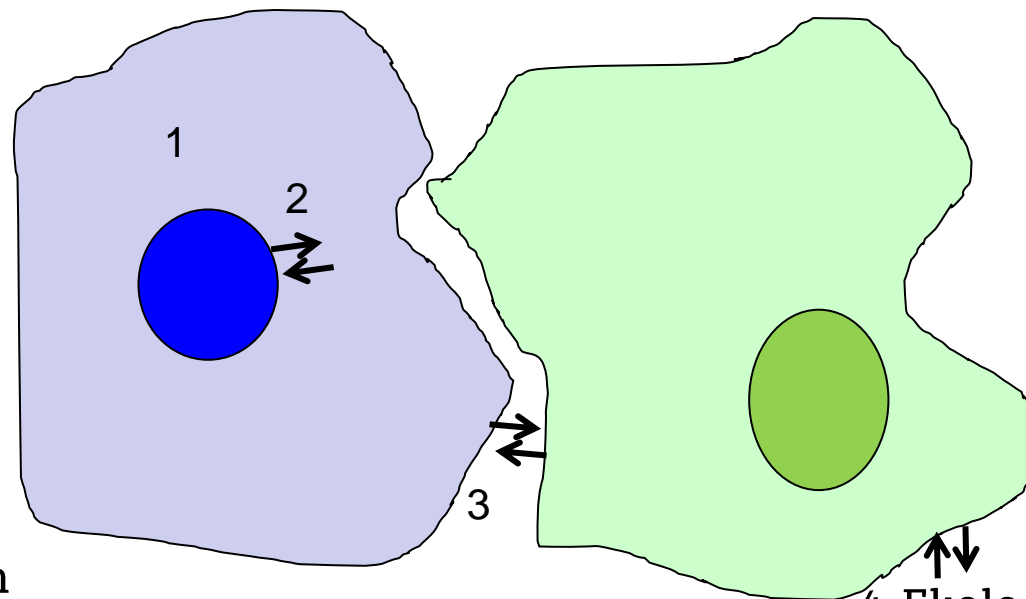
- "*In vitro*" hazkuntza, zelulak baldintza esperimental kontrolatuetan mantentzeko eta proliferatzeko beharrezkoa denean erabiltzen den oinarrizko teknika bat da.
- *In vitro* hazkuntzetan bai mikroorganismoak, landare zelulak eta animalia zelulak mantendu daitezkeen arren, normalean hazkuntza zelularrei buruz hitz egiten dugunean animalia zelulez ari gara.



# Zelulen hazkuntzen aplikazioak

Zelulen eta Molekulen ikerketa barruan zelulen hazkuntzen erabilpena oinarrizko tresnan bilakatu dira, izatez zeluletan gertatzen diren ia edozein funtzio edo prozesu aztertu daiteke baldintza kontrolatuetan.

1. Zelulen jarduera:  
DNAREN transkripzioa,  
proteinen sintesia
2. Zelulen barneko fluxua:  
RNA, hormonak,  
metabolitoak...
3. Zelula-zelula  
interakzioak, enbrioaren  
indukzioa, zelulen  
kooperazioa, kontaktu  
bidezko inhibizioa



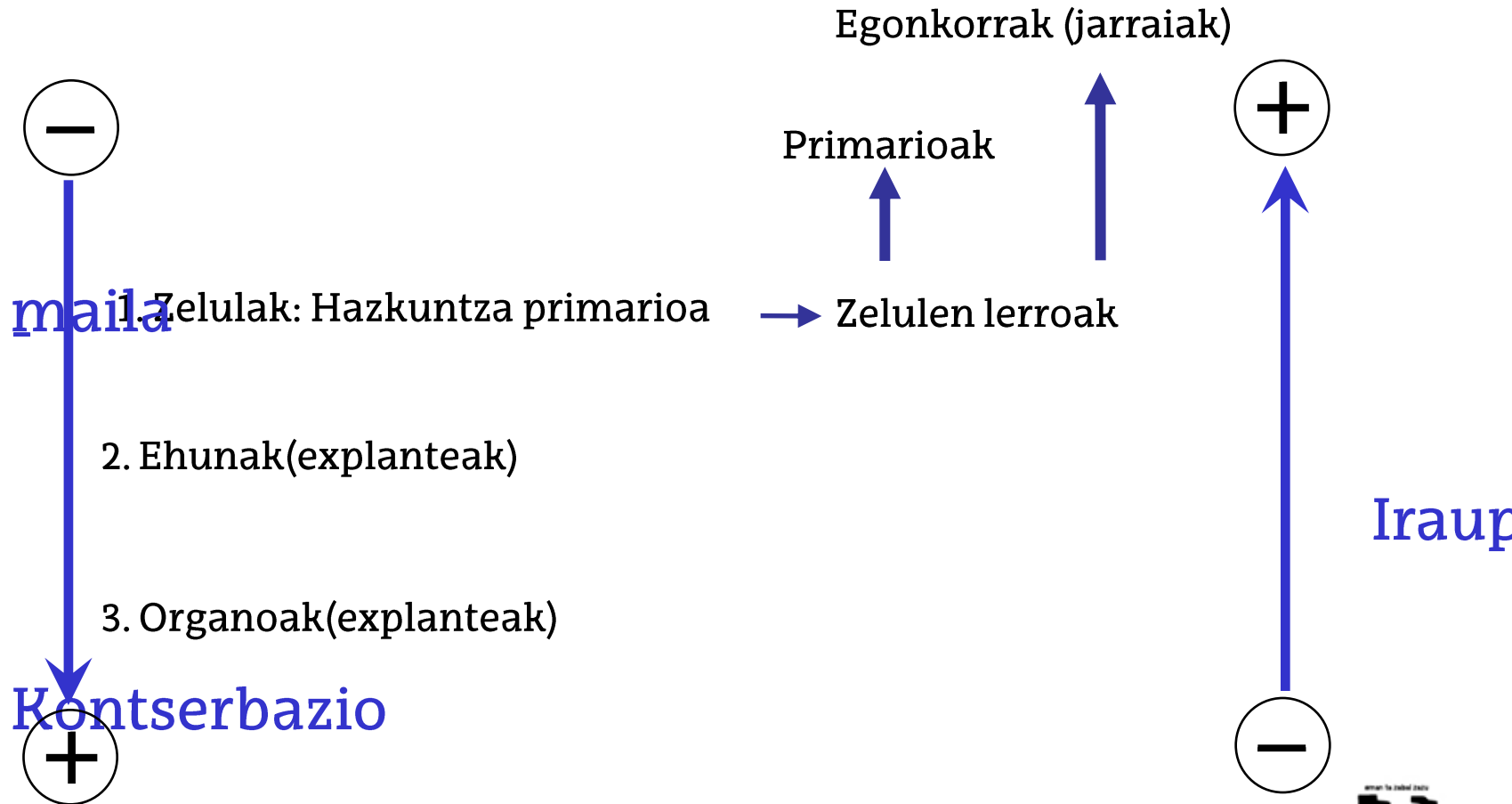
4. Ekologia:  
populazioen zinetika,  
drogak...



## Zelulen hazkuntzen definizioa

- “in vitro” hazkuntza jatorrizko organismotik kanpo **zelulen mantenua** baimentzen duten tekniken taldeari deritzo non zelulen ezaugarri fisiologiko, biokimiko eta genetikoak beraien maximoan mantentzen diren denbora tarte aldakor batean.
- Hazkuntzan hainbat erizpideren arabera sailkatzen dira:
  1. Jatorrizko ehun edo organoaren egituraren **kontserbazio-maila.**
  2. **Hazkuntzen iraupena**

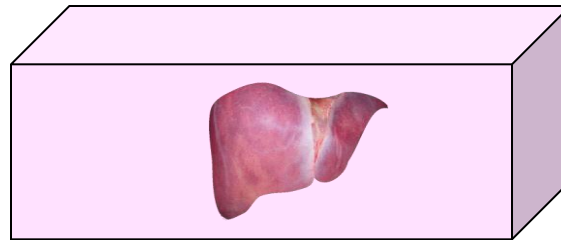
# Hazkuntza-moten eskema



1. Jatorrizko ehun edo organoaren egituraren **kontserbazio-mailaren** arabera, hazkuntzen sailkapena hurrengoa da:
  - a) **Organoen hazkuntzak:** Organo osoa edo organoen zatiak.
  - b) **Ehunen hazkuntzak (explanteak):** ehunak edo ehunen zatiak
  - c) **Zelulen hazkuntzak:** Hazkuntza baino lehen edo hazkuntza bitartean organotik eskuratutako zelulak.

## a) Organoen hazkuntzak

- Ehunen hiru dimentsiotako arkitektura mantentzen da.
- Zelulen arteko elkarrekintzak mantentzen dira, eta beraz zelulen desberdintzapena mantentzen da
- Zelulek proliferazio mugatua dute, beraz beraien hedapena galarazten da. Hori dela eta emaitzen errepikakortasuna oso baxua da.



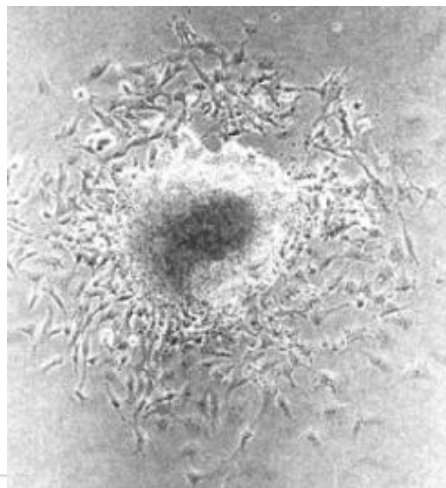
By Mikael Häggström - File:Human Hepar.jpg, Public Domain,  
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=11657184>





## b) Ehunen hazkuntza (explanteak)

Ehunen barneko zelulak hazkuntza batean daude, medioan dauden elikagaietara ezin dira atzitu eta beraz denbora tarte bat igaro ondoren hiltzen dira.. Periferian dauden zelulak proliferatu eta migratzen dute. Ondorioz, hazkuntza mota hau zelulen hazkuntza baterantz eboluzionatzen du.

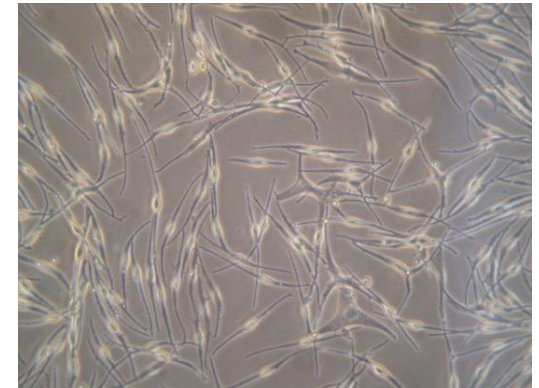


<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Humanstemcell.JPG/300px-Humanstemcell.JPG>



## c) Zelulen hazkuntza

- Ehun baten disgregazio (entzimatikoa edo mekanikoa) edota explante baten eboluzioz sortzen da
- Zelulak substratura atxikituta egon daitezke (hazkuntza itsaskorra) edo suspentsioan egon daiteke
- Zelulak ontzi osoaren azalera bete arte proliferatu dezakete, beraz ugaltu daitezke.
- Normalean zelula homogeneoen populazio batez osaturik dago, eta zelulen lerroa izena hartzen du
- Zelulen lerroak primarioak edo jarraiak izan daitezke (*Unchern,1999*)



Berezko irudia

## 2. Hazkuntzen iraupenaren arabera hazkuntza-mota desberdinak bereizten dira

- a) **Hazkuntza primarioa:** Zuzenean organismotik hartzen diren zelulak, ehunak edo organoak. Beraien biderakortasuna denbora-tarte mugatua du eta ez dira hazkuntzetan ugaltzen.
- b) **Zelulen lerroak:** Hazkuntza primarioen ondoz ondoko azpi hazkuntzetatik lorturiko zelula homogeneoen hazkuntzak. Hauek honela sailkatu daitezke:
- **Hazkuntzen lerro primarioa:** zelula hauek zatitzeko ahalmen mugatua dute; hainbat zatiketa eta gero seneszentzian sartzen dira eta hiltzen dira. Bizitza mugatua dute.
  - **Hazkuntzen lerro jarrai edo egonkorra:** zelula hauek zatitzeko ahalmen mugagabea dute, eta ez dute beraien zatitzeko ahalmena galtzen. Bizitza infinitoa dute, zelula "hilezkoak" dira.



# Hazkuntza primarioa eta zelulen lerroa

**Hazkuntza primarioa:** zuzenean ehunetatik edo organorik eratorritako zelulez osaturik (proliferatzen dute)

↓  
Bilketa berrereitea (azpiaskuntza/pasea)

**Hazkuntza seriatuak**

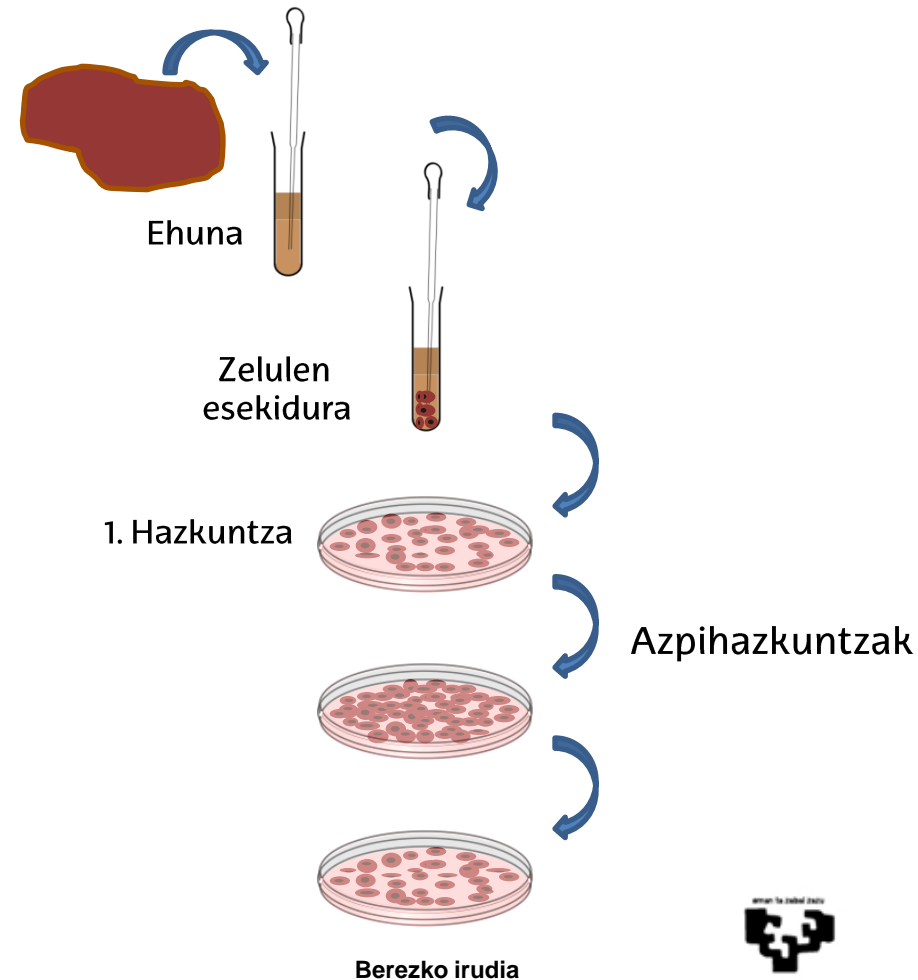
Zelula-mota baten nagusitasuna

**Zelulen lerroa**

•Primarioa

•Jarraia

**Zelulen lerro baten jatorria**



## Zelulen hazkuntzen mantenua

- Zelulen hazkuntzak **beirazko edo plastikozko** ontzietan jartzen dira eta superbizipenerako zein hazkuntzarako beharrezkoak diren elikagaiak dituen medio likidoan daude.
- Medioaren konposizioa aldakorra bada ere, oinarrizko zenbait osagai ditu: indargetutako disoluzio gazia, aminoazidoak, bitaminak, glukosa eta oligoelementuak.
- Oinarrizko medioa hormonekin edota **hazkuntza-faktore** espezifikoekin osatzen da medio definituen kasuan edota jatorri desberdineko (behi-fetu, txahal...) serum-arekin medio ez definituetan.
- Gainera, espektro zabaleko **antibiotikoak** (penizilina/estreptomizina) eta onddoen aurkako (fungizona, anfoterizina-B) konposatuak erabiltzen dira kutsadurak ekiditzeko.
- Hazkuntza-ontziak baldintza fisiko egokiak mantentzeko (tenperatura, hezetasuna, CO<sub>2</sub> gehipena) inkubagailuetan mantentzen dira.



Berezko irudia



[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Binder\\_CB\\_210\\_incubator\\_interior.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Binder_CB_210_incubator_interior.jpg)



# Zelulen lerroak erabiltzeko oinarrizko prozedurak

## 1.- Ereintzerako zelulen lorpena

Hazkuntza-lerro gehienak plastikora itsatsita hazten dira eta hazkuntza gelditzen da dentsitate altuetan kontaktu bidezko inhibizioa dela eta. Lerro bakoitzaren morfologia eta ezaugarrien arabera plakaren azalera osoa betetzen dutenean edota inguruko zelulekin kontaktuan daudenean (plastiko osoa bete gabe ere) zatitzeari uzten diote. Egoera honi (dentsitatea) **hazkuntzaren bateratzea** deitzen zaio.

Ez da komenigarria hazkuntza bat luzaroan bateratua uztea. Zelulen dentsitatea momentuoro txikitzea gomendatzen da, modu horretan hazkuntza modu jarraian gertatzea baimentzen da.



# Zelulen lerroak erabiltzeko oinarrizko prozedurak

## 2.- Azpihazkuntzak

Azpi-hazkuntza edo pasea lan egin daitekeen zelulen kopurua baimentzen du, izan ere zelulak jazo eta ontzi berritan berrereiten dira.

a) Azpi-hazkuntza egin arte erabili den azalera berdina erabili nahi bada eta zelulen lerroa zatitzen jarraitzea nahi badugu, zelula batzuk baztertuko dira.

b) Zelulen kopuru total handitu nahi bada, ditugun zelula guztiak ontzi gehiagotan banatuko dira.

Bi kasuetan, zelulen dentsitatea txikitu egiten da. Txikipena lerro bakoitzaren arabera ladatuko da, baina normalean %80-%90 ingurukoa izango da (1/5 edo 1/10 pasea, hurrenez hurren).



# Zelulen lerroak erabiltzeko oinarrizko prozedurak

## 3.- Bilketa edo tripsinizazioa

Zelulak maneiatu baino lehen, zelulen itxura aztertu behar da fase-kontrasteko alderantzizko mikroskopia erabiliz. Euskarrira atxikitzen diren zelulak badira, hauen banaketarako disoluzio entzimatiko bat (tripsina, adibidez) eta kaltzioaren kelante bat (EDTA, adibidez); erabiltzen da. Bi produktu hauek zelula-euskarri loturak apurtzen dituzte eta baita zelula-zelula loturak ere. Prozesu hau kontu handiz egin behar da, izan ere zelulak suntsitu ditzake digestio oso baten bitartez.

Zelulak banatu direnean, ontzira serum-a duen medioa gehitzen da. Serum-ean tripsina inhibitzen duten molekulak daude, honen erreakzioa geldituz eta zelulen suntsipena ekidituz.





## Bilketaren prozedura



Berezko irudia

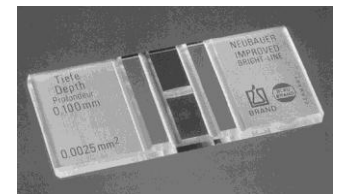
- Media dekantatu.
- Tripsina/EDTA disoluzioa gehitu.
- 5´ inkubatu 37°C-tan.
- Mikroskopioan behatu.
- Media gehitu.
- 15ml-ko ontzian jaso.
- 1500 bira minutuko 5´ zentrifugatu.
- Gainjalkina baztertu.
- Media gehitu eta berreseki.

## Zelulen lerroak erabiltzeko oinarrizko prozedurak

### 4.- Zelulen kontaketa eta bideragarritasunaren analisia *Neubauer* globulu-zenbatze ganbara batean

Esekiduran dauden zelulen dentsitatea ezagutzeko teknika desberdinak erabili daitezke. Oinarrizkoena eta ohikoena zelulen kontaketarako ganbara bat, *Neubauer* ganbara, eta mikroskopia erabiltzean oinarritzen da.

*Neubauer* ganbara argi mikroskopiarako eta fase-kontraste mikroskopiarako moldatutako kontaketarako ganbara bat da. Erdiko aldean sakonune bat duen portaobjektu bat da, azpian irudian ikusten den kuadrikula bat markatzen da. 3 x 3 mm-tako lauki bat da eta lerroak elkarren artean 0.25 mm-tako banaketa bat dute.

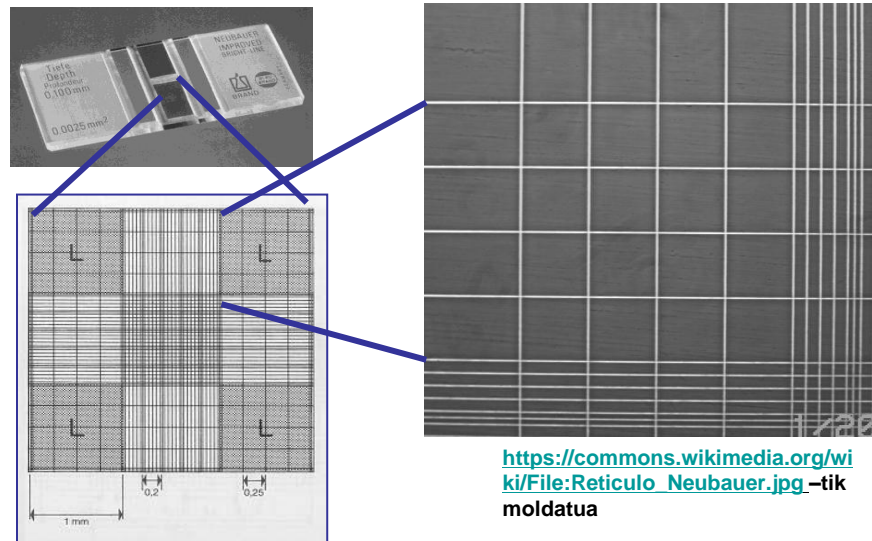


[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo\\_Neubauer.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Reticulo_Neubauer.jpg)  
-tik moldatua



# Zelulen lerroak erabiltzeko oinarrizko prozedurak

## 4a.- Neubauer ganbarako zelulen kontaketa



Irudian L batez markaturiko itzaltutako aldea,  $1\text{mm}^2$  azalerari dagokio. Erdiko aldean dagoen sakonunea  $0.1\text{ mm}$  dago barneratuta azalerarekiko, beraz, estalkia jartzen denean, hau markatutako azaleratik  $0.1\text{ mm}$ -tara dago, beraz L azalera eta estalkiak mugatzen duten bolumena  $0.1\text{ mm}^3$ -koa da, hau da,  $0.1\ \mu\text{l}$ .



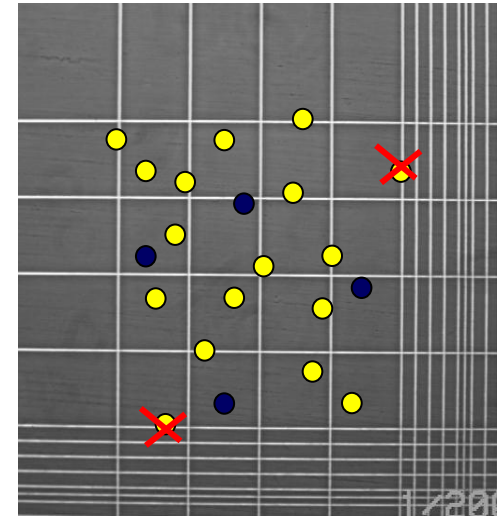
## Zelulen lerroak erabiltzeko oinarrizko prozedurak

### 4b.- Zelulen bideragarritasuna *Neubauer* ganbaran

•Zelulen bideragarritasuna zehazteko ere metodo desberdinak erabiltzen dira. Hauen artean ohikoena **tripan urdina** da.

•Tripan urdina pisu molekular handiko koloreztatutako koloide bat da eta soilik mintza kaltetuta dituzten zeluletan sartu daiteke. Beraz, baldintza egokitan dagoen zelula bizia kolorerik gabe mantenduko da eta hilda edo oso kaltetuta dagoen zelula urdinez tindatuko da.

•Modu honetan zelulen bideragarritasuna zehazten da, bizirik dauden zelulak eta hilik dauden zelulak kuantifikatu daitezke



- Bizirik dauden zelulak
- Hilik dauden zelulak
- ✗ Laukiko barne-ertzean dauden zelulak ez dira kontutan hartzen



## Neubauer ganbararen erabilpenerako prozedura

- Zelulen esekidurako lagin bat hartzen da ( $\pm 40 \mu\text{l}$ ) eta Tripan urdinaren (%1) bolumen berdina (1:1) gehitzen zaio. Zelulak nahasten dira sakabanatzea bermatzeko.
- Neubauer ganbaran zelulen disoluziuo diluitua jartzen da.
- Laukiaren 4x4 zonaldeko lau zelaietan zelulen kontaketa burutzen da.
- Kontatzen den zelai bakoitzaren zelulen bolumena  $1 \times 1 \times 0,1 \text{mm}^3 = 0,1 \text{mm}^3$  ( $0,1 \mu\text{l}$ ) denez, disoluzioaren **zelulen kopurua/ml** hurrengoa izango da: lau zelaietan neurtutako zelulen kopurua  $\times 10^4 \times 2$  (diluzio-faktorea).
- Tripan urdina tindaketaren araberrako **bideragarritasuna**: (zelula zuriak/zelula guztiak)  $\times 100 = \% \text{ bideragarritasuna}$



## Zelulen hazkuntzen eta beraien mantenuaren inguruko tutoretza:

- Cell Culture Basics from Gibco [Internet]. Thermo Fisher Scientific [2011-ko Abenduak 21; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. Eskuragarri:  
<https://www.youtube.com/watch?v=kbhQ29vRqs4>
- Passaging Cells: Gibco Cell Culture Basics Gibco [Internet]. Thermo Fisher [2011-ko Abenduak 21; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. Eskuragarri:  
[https://www.youtube.com/watch?v=z\\_aK6pH3\\_G8](https://www.youtube.com/watch?v=z_aK6pH3_G8)



## 2. Immunohistokimika

- Immunohistokimika eta immunozytokimika teknikak antígeno-antigorputz lotura espezifikoetan oinarritzen diren teknikak dira.
- Immunohistokimikan identifikatu nahi den molekula (antigenoa) modu espezifikoan ezagutu eta beraietara lotzen diren **antigorputzak** erabiltzen dira. Horrela, ehunetan eta zeluletan antigenoen banaketa eta presentzia aztertu daitezke.
- Antigenoen banaketa zeluletan edo ehunetan zehazteko guztiz beharrezkoa da antigenoen morfologia mantentzea eta zonalde antigenikoak eskuragarri egotea. Finkapen eta iragazkortasun teknikak berebiziko garrantzia dute.



## Zelulen finkapena

- Zelulen **finkapena** berebiziko garrantzia duten lau paper jokatzeko ditu immunohistokimikan:
  - Zelulen morfologia eta ehunen arkitektura egonkortu
  - Entzima proteolitikoak inaktibatu
  - Prozesamendua eta tindaketa pairatuko duten laginak indartu
  - Laginak deskonposizio prozesutaz eta mikrobioen kutsaduraz babestu
- Immunohistokimikaren kasuan ez da soilik antigenoaren ibilgetze azkar eta definitibo bat eskatzen, baizik eta hauen immunoerreakzionagarritasunaren mantenua eta eskuragarritasuna ere mantendu behar da kokapena burutu ahal izateko.
- Zelulen finkapena burutzeko hainbat prozedura fisiko eta kimiko daude eta aplikatu daitezke. Hala ere, gehien erabiltzen den finkatzailea formaldehidoa da, eta itu zelular gehienentzat espezifikotasun handia erakusten du.





## Zelulen iragazkortasuna

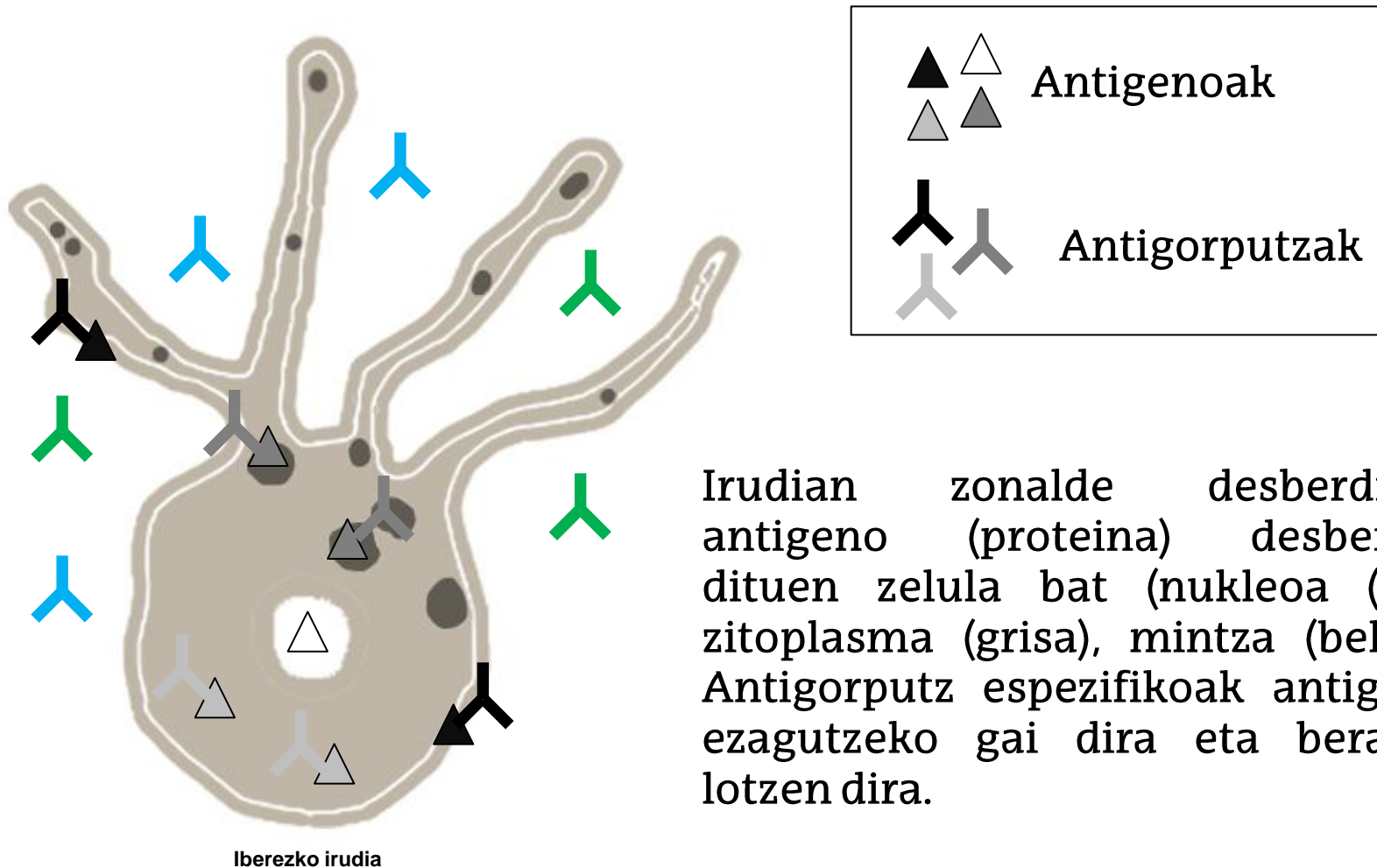
- Zelulen iragazkortasuna guztiz beharrezkoa da zelulen barneko epitopoak eta transmintz proteinak detektatu ahal izateko.
- Kasu hauetan, proteina detektatu ahal izateko antigorputzak zelularen barne aldera sartu behar dira eta horretarako nolabaiteko iragazkortasun-prozesu bat aplikatu behar da.
- Ohikoena detergenteak gisako substantziak (Tritón-X, tween...) iragazle gisa erabiltzea da.



## Antigeno-antigorputz elkarrekintza

- **Antigeno-antigorputz** elkarrekintza antigenoaren eta antigorputzaren artean lotura ez kobalenteen bitartez (Hidrogeno loturak, Van der Waals...) gertatzen den elkarrekintza kimiko bat da.
- Antigeno eta antigorputz aniztasun handia dago, eta elkarren arteko ezagumendua eta elkarrekintza antigorputz bakoitzaren eraketa kimiko espezifikoan oinarritzen da.
- Antigorputzak (immunoglobulinak) sistema immuneko B linfozitoek sortzen dituzten glikoproteínak dira, eta hauek organismoarentzat arrotzak diren substantziak (bakterioak edo birusak adibidez, antigenoak) identifikatu eta neutralizatzeko gai dira.



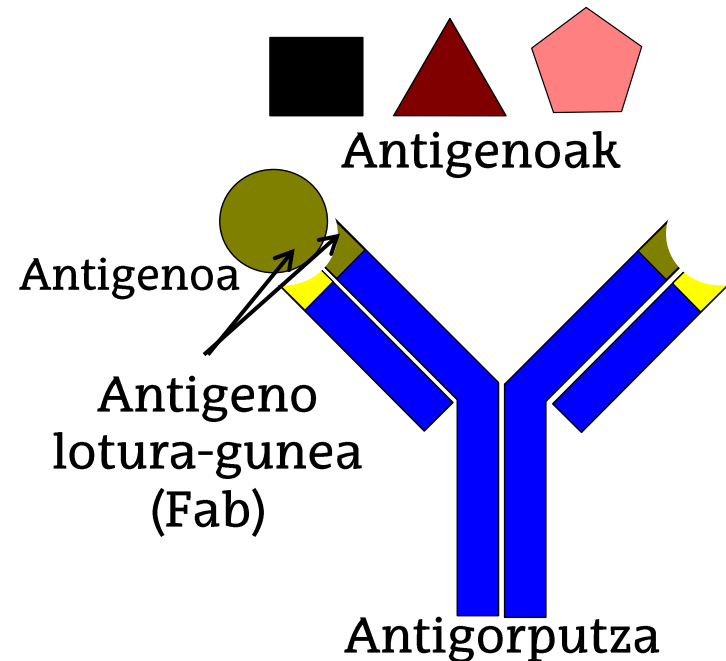


Irudian zonalde desberdinetan antigeno (proteina) desberdinak dituen zelula bat (nukleoa (zuria), zitoplasma (grisa), mintza (beltza)...). Antigorputz espezifikoak antigenoak ezagutzeko gai dira eta beraietara lotzen dira.



## IgG Immunoglobulina

Immunoglobulinak, antigorputzak sortzen dituzten molekulak, familiaren barruan teknika immunohistokimiketarako nabarmenenak IgG taldekoak dira. IgG immunoglobulina Y itxurako egitura bat sortzen du eta 4 kate polipeptidiko osaturik dago (zubi disulfuro loturiko 2 kate arin, ~25K Da eta 2 kate astun ~50 KDa).



Adarkatutako ertzean Fab (Fragment antigen binding) zonaldea dago, eta gune hau da antígeno-antigorputz loturaren arduradun nagusia. Fab zonaldean kate arin bat eta kate astunaren N-terminal gunea daude.

## Antigorputz-motak eta erabilpenak

- Animalien sistema immuneak antigenoak modu espezifikoan lotzeko antigorputzak ekoizteko duen ahalmena, interesezko molekulak detektatzeko markatzaileak sortzeko aukera ematen du.

- Orokorki Zelulen Biologian erabiltzen diren hiru motako antigorputzak daude.

a) Antigorputz poliklonalak

b) Antigorputz monoklonalak

c) Antigorputz errekonbinanteak

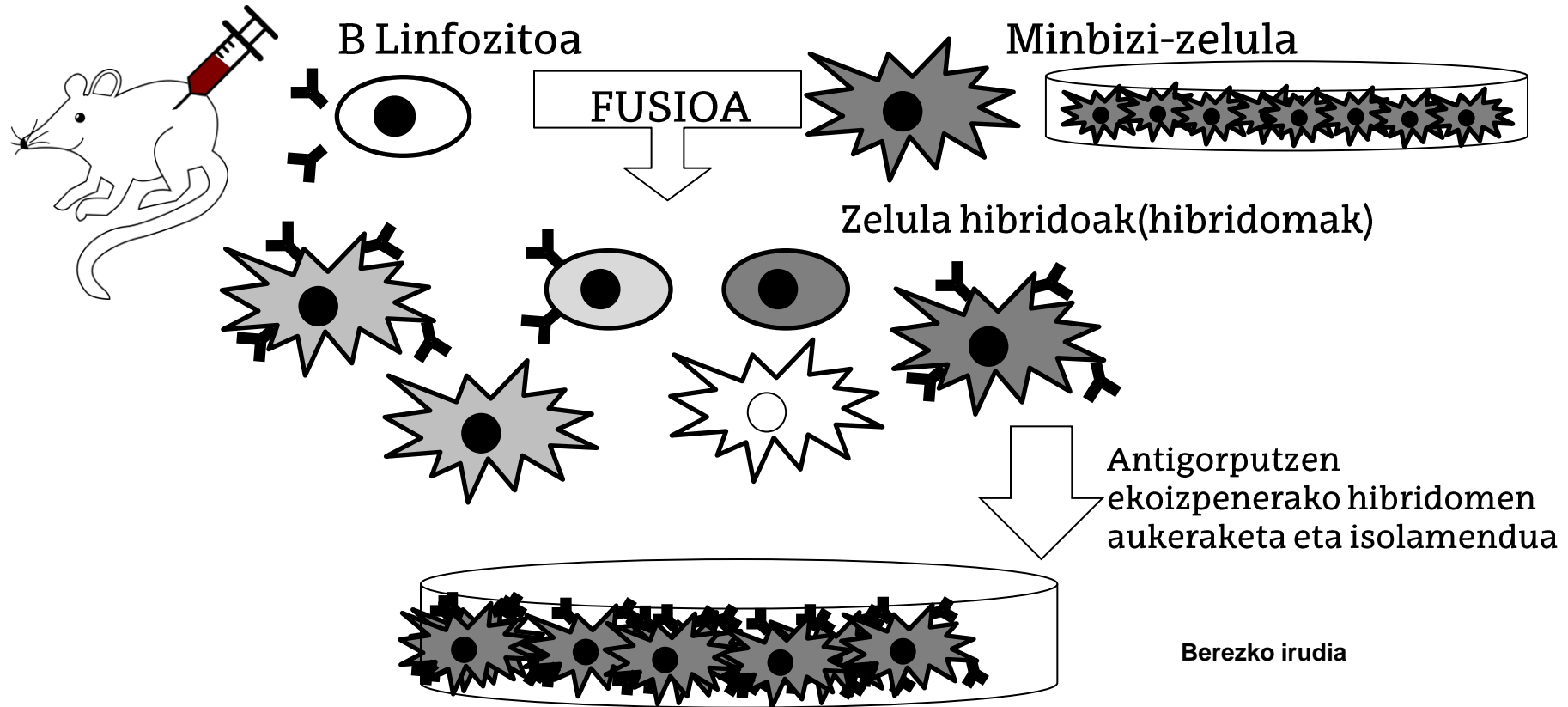


## Antigorputz-motak

- Antigorputz **poliklonalek** zehaztutako antigeno baten injekzio bitartezko animalien immunizazioa beharrezkoa dute. Substantzia arrotz bat (antigenoa) animalia-aren gorputzean injektatzen denean, zelula bakoitzak (B linfzitoa) antigorputz mota bakar bat sortzen du, baina B linfzito desberdinek egituralki desberdinak diren antigorputzak sortuko dituzte eta hauek antigenoaren zonalde desberdinetara lotuko dira. Antigorputzen nahasketa fisiologiko natural honi, "antigorputz poliklonal" gisa ezagutzen da. Bere erabilpenerako oso garrantzitsua da antigorputzen isolamendu egokia burutzea animalien fluidoetatik. Lortzen den antigorputzaren espizikotasun-maila aldakorra da.
- Antigorputz monoklonalak, Sistema immuneko zelula-ama bakr batek sorturiko antigorputz identikoak dira. Zelulen aplikazioarako, antigorputz monoklonalak hilezkoprra den mieloma eta antigorputzak askatzen dituen zelulen fusioz sorturiko hibridomen zelulen lerroetatik abiatuz sortzen dira. Antigorputz monoklonalak erabiliz lortzen diren emaitzak, poliklonalekin lortzen direnak baino errepikakorragoak dira eta horregatik gehienetan aukeratu dira..



# Antigorputz monoklonalen lorpena



Antigorputz monoklonalak eskuratzeko animalia kitzikatzen da intereseko antigenoa injektatuz. Ondoren, areako zelula immuneak lortzen dira eta transformatutako zelulekin fusionatzen ditra zelula hibridoa lortuz, antigorputzak sintetizatzeke gai dena eta etengabe hazteke gai dena.



## Antigorputz monoklonal eta poliklonalen arteko konparaketa

<b>ANTIGORPUTZ POLIKLONALAK</b>	<b>ANTIGORPUZ MONOKLONALAK</b>
Espezifikotasun espektro zabalagoa	Oso espezifikotasun konkretua
Ekoizpen erraz eta merkea	Ekoizpen garestia eta nekeza
Erreakzio inespezifikoak sortzeko arrisku altuagoa	Espezifikotasun altua
Isolamendu nekeza	Isolamendua ez da beti beharrezkoa
Erreaktibo mugatua/aldakorra	Antigorpotzen iturri mugagabea





## Antigorputz errekonbinanteak

- Antigorputz poliklonal eta monoklonalez gain azkenengo hamarkadatan animaliak erabili gabe antigorputzak sortzeko teknikak garatu dira.
- Hauek antigorputz errekonbinanteak dira eta bakterio zein legamien hazkutzetan genetikaren ingeniari-tza teknikak erabiliz lortzen dira.
- Horretarako immunoglobulinak kodifikatzen dituzten geneen atalak klonatzen dira antígenoetara lotzeko ahalmena gordetzen duten antigorputzen libreria sortuz.
- In vitro* sintetizatutako molekula hauek dituzten abantailen artean beraien tamaina txikia dago, beraz ehunetan errezago barneratu daitezke.

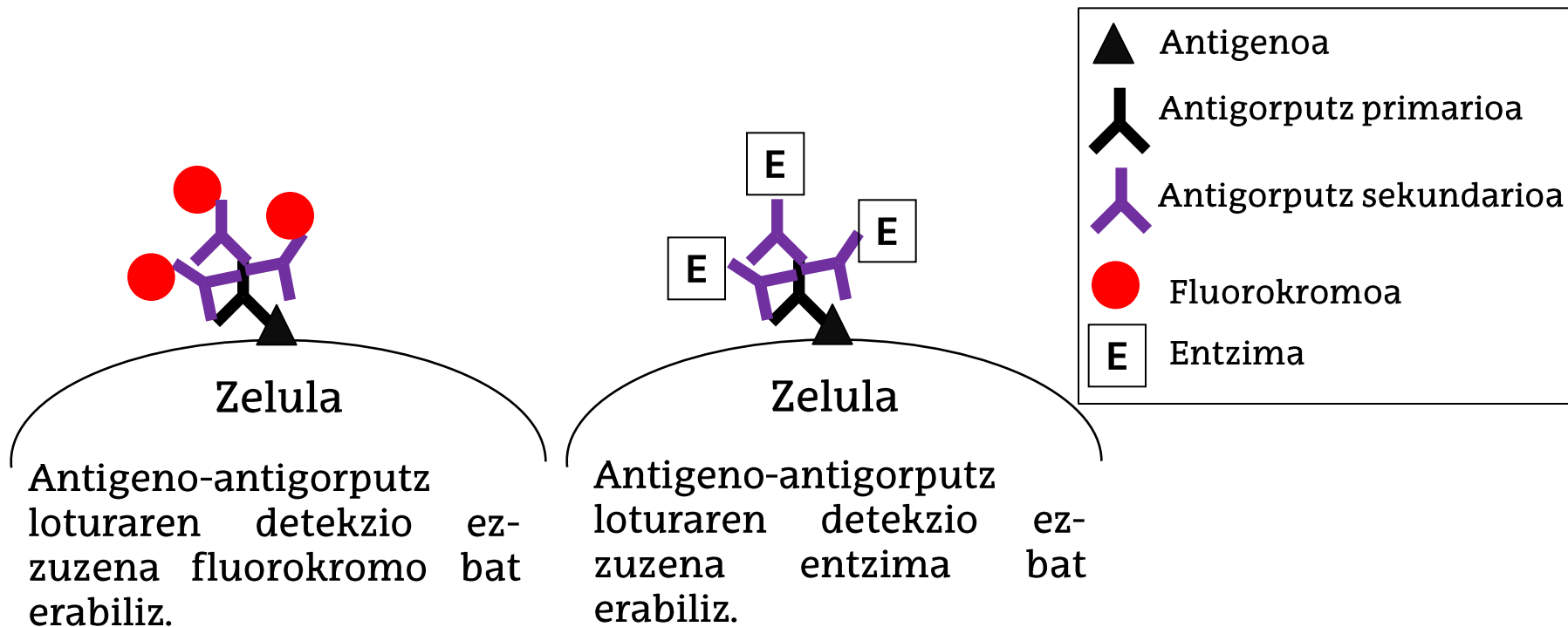


## Detekzio metodo ez-zuzena

- Antigeno-antigorputz elkarrekintza ikusteko, elkarrekintza hau gertatu denean seinale edo tindaketa sistema bat beharrezkoa da bat.
- Gehien erabiltzen den metodoa antigorputz sekundario bat erabiltzean datza non antigorputz sekundario honek, lehenengo antigeno-antigorputz elkarrekintza burutu eta gero, alde aurretik loturiko molekula "reporter" bat daraman; adibidez entzima edota fluorokromo bat.
- Antigorputz sekundario hau normalean beste espezie baten IgG immunoglobulinen aurka diseinatuta dago. Adibidez, lehenengo antigorputza untxian ekoiztu bada, antigorputz sekundarioa untxien IgG-a ezautzen duen beste animalia batean ekoiztua egon behar du.
- Detekzio metodo honi, **detekzio ez-zuzena** deitzen zaio.



## Detekzio metodo ez-zuzena



## Detekzio metodo zuzena

- Detekzio metodo zuzenean urrats bakar batean geratzen da, izan ere interesezko antigenoa ezagutzen duen antigorputza fluorokromo batez (adibidez) markaturik dago.
- Teknika honen bitartez antigorputz bakar bat erabiltzen den bitartean, eta beraz ximpleagoa eta azkarragoa da, sentikortasuna txikiagoa da, izan ere ez da seinalearen amplifikaziorik geratzen, teknika ez-zuzenetan gertatzen den moduan.

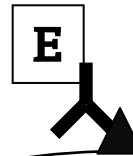


## Detekzio metodo zuzena



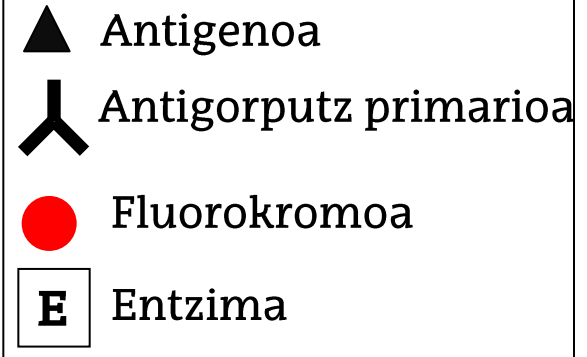
Zelula

Antigeno-antigorputz loturaren detekzio zuzena fluorokromo bat erabiliz.



Zelula

Antigeno-antigorputz loturaren detekzio zuzena entzima bat erabiliz.



## Detekzio zuzena vs. ez-zuzena

- Normalean metodo zuzenek zenbait arazo aurkezten dituzte, besteak beste antigorputz primario guztiak markatzearen beharra, prozesu hau luzea eta nekeza izateaz gain, antigorputzen erreakzionagarritasunean eragin dezake.
- Beste alde batetik, metodo ez-zuzenen kasuan, antigorputz primarioaren manipulazioa ekidin egiten da, eta antigorputz sekundarioak espezien jakin batekiko espezifikoak izanik, antigorputz primario desberdinekin erabili daitezke (beti ere espezie berdinean sortutako antigorputz primarioa bada).
- Gainera, metodo ez-zuzenen bitartez, **seinalearen anplifikazio** bat lortzen da, izan ere hainbat antigorputz sekundario lotu daiteke antigorputz primario batean.



### 3. Melaninaren kuantifikazioa

- Melanina melanozitoek sorturiko pigmentu bat da eta melanosometan metatzen da exozitatu aurretik.
- Hori dela eta, zelulen barneko melanina-kopurua ezagutzeko, zelulak lisatu behar dira barne edukia eskuratuz.
- Lisatze ohiko metodo bat zelulak NaOH 1 N 60°C-tan eta ordu batez inkubatzean datza.
- Melaninak 405 nm-tan xurgatzen du, beraz zelulen lisatuaren absorbantziaren analisia zelula kopuru totalarekiko neurtzen dugunean, interesezko zelulen populazioak zenbat melanina sintetizatzen duen jakingo dugu.



## Bibliografia

- Cell Culture Basics from Gibco [Internet]. Thermo Fisher Scientific [2011-ko Abenduak 21; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. Eskuragarri: <https://www.youtube.com/watch?v=kbhQ29vRqs4>
- Passaging Cells: Gibco Cell Culture Basics Gibco [Internet]. Thermo Fisher [2011-ko Abenduak 21; 2016-ko Urriak 25-ean zitatua]. Eskuragarri: [https://www.youtube.com/watch?v=z\\_aK6pH3\\_G8](https://www.youtube.com/watch?v=z_aK6pH3_G8)
- *Unchern S. BASIC TECHNIQUES IN ANIMAL CELL CULTURE. In Laboratory Practice on Caco-2 Cell Culture. Drug Delivery System Workshop August 19-20, 1999 : Bangkok, Thailand. Eskuragarri: <https://www.hitpages.com/doc/5195013260574720/1#pageTop>*





## KONTSULTARAKO INFORMAZIO GEHIGARRIA

- Bancroft J., Gamble M. 2002. Theory and practice of histological techniques. Ed. Churchill Livingstone. London. 796pp.
- Buchwalow IB., Böcker W. 2010. Immunohistochemistry: Basics and Methods. Ed. Springer. Heidelberg. 153pp.
- Burry, Richard W. Immunocytochemistry: A Practical Guide for Biomedical Research. 2010. Ed. Springer Fresney R.I. 2005. Culture of animal cells. 5th ed. Wiley
- Duraiyan J, Govindarajan R, Kaliyappan K and Palanisamy M. **Applications of immunohistochemistry.** *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug; 4(Suppl 2): S307–S309
- Montuenga L., Esteban FJ., Calvo, A. 2009. Técnicas en histología y biología celular. Ed. Elsevier Masson. Barcelona. 392pp.

