

HÜCREYİ İNCELEME YÖNTEMLERİ

İMMUNOHİSTOKİMYA ve TUNEL

H. SEDA VATANSEVER

Celal Bayar Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji AD

MANİSA

sedavatansever@yahoo.com

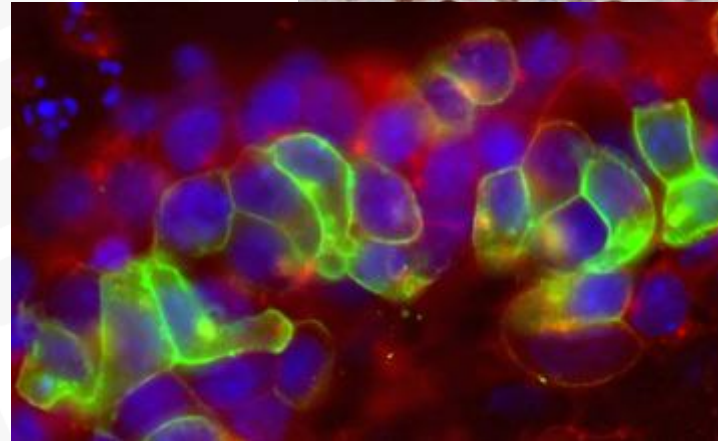
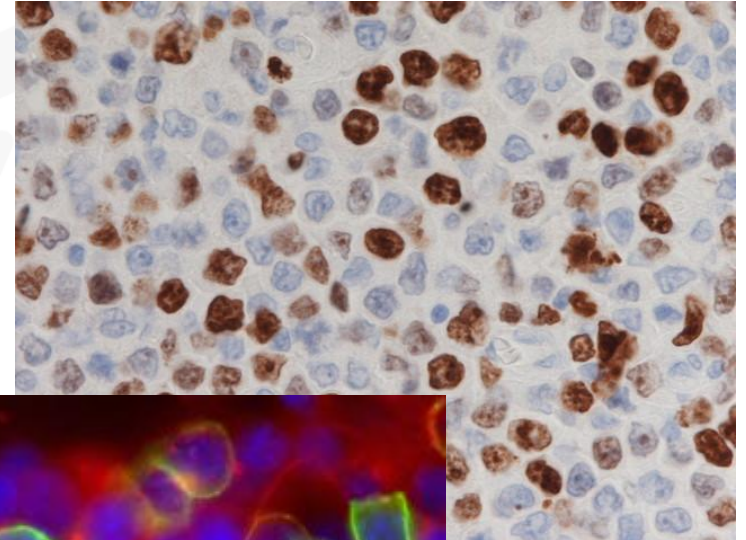
İmmunohistokimya

Protein Analiz Yöntemleri

- ELISA
- Gel Elektorforezi
- Western blot
- Immunopresipitasyon
- Spektrofotometri
- Enzim assay
- X-ray kristalografi
- İmmunohistokimya

İmmunohistokimya

- ❑ Antijeni görünür hale getirmek
- ❑ Antikor-antijen kompleksi
- ❑ Yeri
 - Sitoplazmik
 - Nükleer
 - Hücre membranı
- ❑ Sayısı



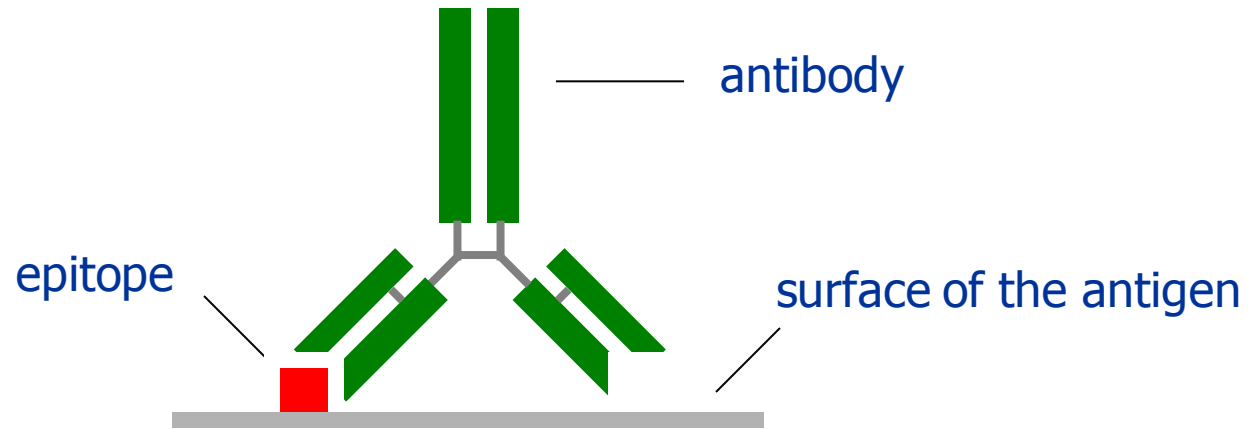
Antijen ve Antikor

Antijen

- **Antijen** antikora spesifik olarak bağlanan protein veya glikoprotein
 - Kesitler (Parafin, Frozen, Epon, Araldit)
 - Hücre kültür hücreleri
 - Kan yayma örnekleri
 - Aspirasyon sıvıları
 - Embriyolar

Antijen

- Antijen antikora sfesifik olarak bağlanır

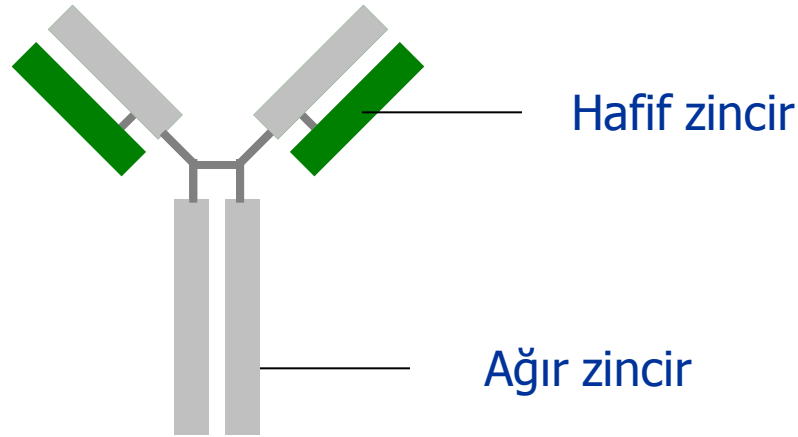


Antikor

- ❑ **Antikor** bir antijenle ilişki kurarak antijene karşı cevap oluşturan bir serum proteindir.
- ❑ Antikorlar serumlarda bulunan gammaglobulin fraksiyonudur ve genelde **immunglobulin (Ig)** olarak isimlendirilir.
- ❑ İmmunohistokimyada kullanılan antikorlar genelde **IgG** sınıfına aittir.

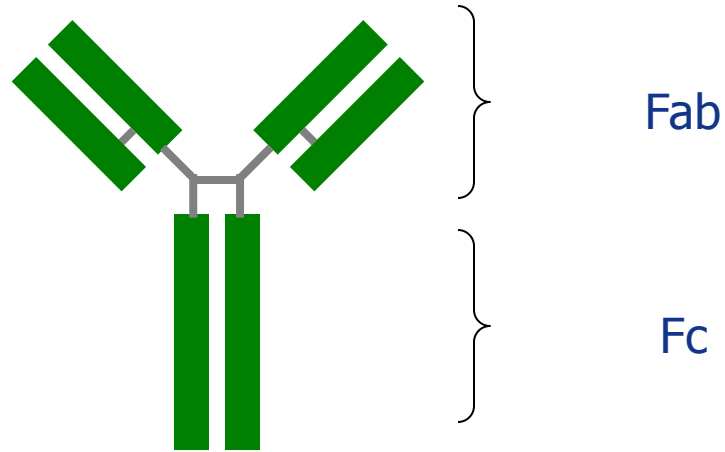
Antikor

- Her antikor 4 polipeptid içerir- 2 **ağır zincir** ve iki **hafif zincir** olarak "Y" şeklinde molekül.



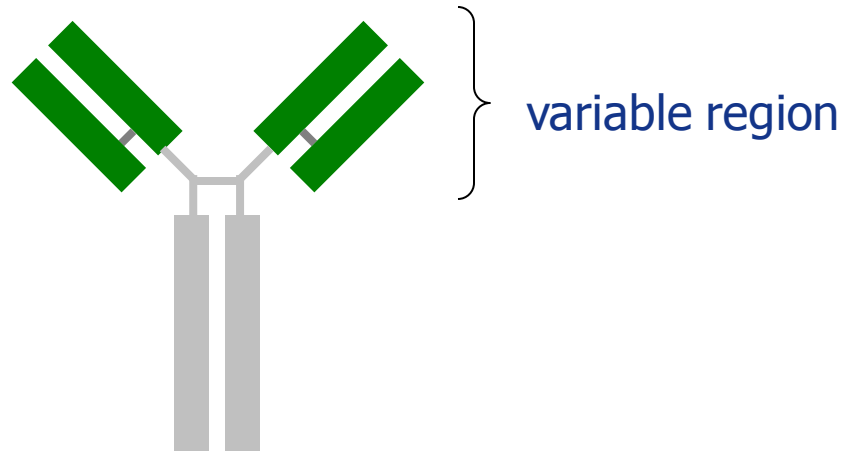
Antikor Yapısı

- Klasik Y yapısında antijen-spesifik kısım **Fab** ve alt kısımda **Fc** olarak adlandırılır.



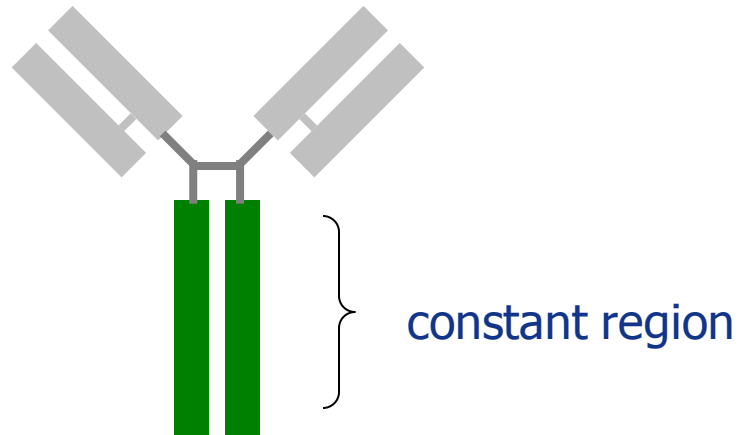
Antikor Yapısı

- ❑ Fab kısmı farklı amino asit yapısında olup, farklı antijenlere spesifik olarak bağlanmasından dolayı **değişken bölge** olarak adlandırılır.



Antikor Yapısı

- ❑ IF, IHC, IHC (P)
- ❑ WB, ELISA, IP, etc



- ❑ Antikorlar kendi içinde: **IgG, IgM, IgA, IgD** ve **IgE**.
- ❑ Ağır zincir kısmı **IgG, IgM, IgA, IgD, ve IgE**, için sırası ile **gamma, mu, alpha, delta** ve **epsilon**.
- ❑ Hafif zincir kısmı ise içerdiği polipeptid yapısına göre **kappa** veya **lambda** olarak tarif edilir.

Antiserum

- ❑ Tavşana ilk subkutanöz enjeksiyonu takiben uygun bir zaman sonra 2. bir enjeksiyon yapılır.
- ❑ Antikorları kontrol etmek için kan alınır.
- ❑ Antikor oluşumu için standart süre verilmez çünkü kişisel bir olaydır.
- ❑ Kan santrifüj edilerek eritrositler ayrılır.
- ❑ Antikor plazmada bulunmasına rağmen kullanılan solüsyon yanlış olarak antiserum olarak adlandırılır.
- ❑ Antiserum ELISA , RIA veya blotting tekniği ile test edilir.
- ❑ Antiserumda en çok olarak IgG bulunduğundan antikorlar IgG yapısındadır.

Antikor-Antijen Reaksiyonu

Antikor-Antijen Reaksiyonu

- Hidrofobik, iyonik, Van der Waals veya hidrojen bağ
- Antijene karşı yüksek afinite de olmalı
- Yüksek bağlanma kuvveti olmalı
- Yüksek konsantrasyonda olmalı

Antikor-Antijen Reaksiyonu

- ❑ Sıcaklık
 - Sıcaklık arttıkça, bağlanma daha hızlı olur.

- ❑ Kullanılan tampon solüsyonun pH
 - pH ve iyon konsantrasyonu hem antikor hemde antijende aminositlerin değişimine olanak sağlar

Antikor Üretimi

Antikor Üretimi

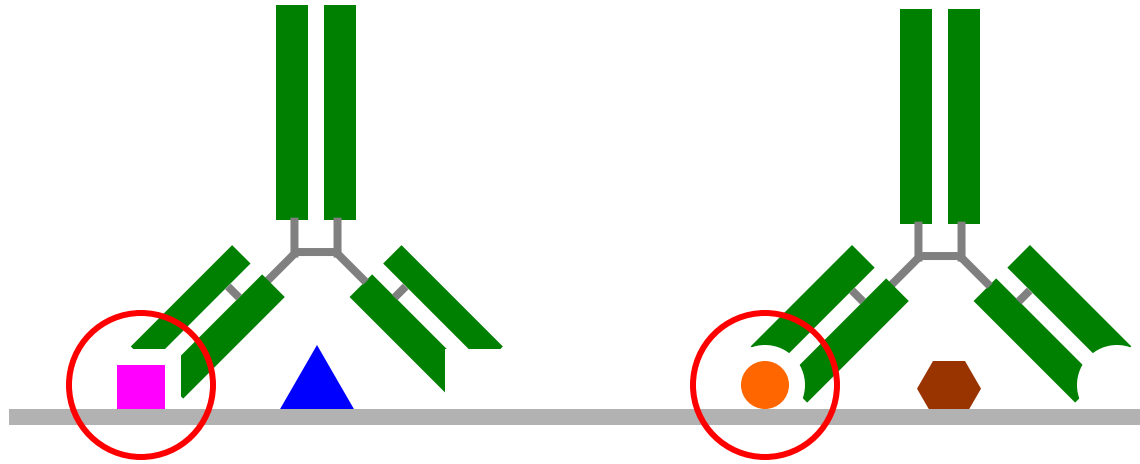
- ❑ Antikorlar deney hayvanlarının immunizasyonu sonucu elde edilir.
- ❑ Poliklonal ve Monoklonal

Poliklonal Antikorlar

Poliklonal Antikor

- ❑ Tavşanları (veya kobayları) antijenle immunize ederek üretilir.
- ❑ Antijen tamamen saf olmalı veya sentetik olmalıdır ki mümkün olduğunca özgün bir antikor oluşabilsin.
- ❑ Dönor hayvanın serumu birçok doğal antikor içerir ve bunlar doku elemanları ile reaksiyona girebilir.
- ❑ O nedenle pozitif görünen bir immunreaksiyon kontroller yapılmadan spesifik ve istenen antijen –antikor reaksiyonu olarak kabul edilmemelidir.

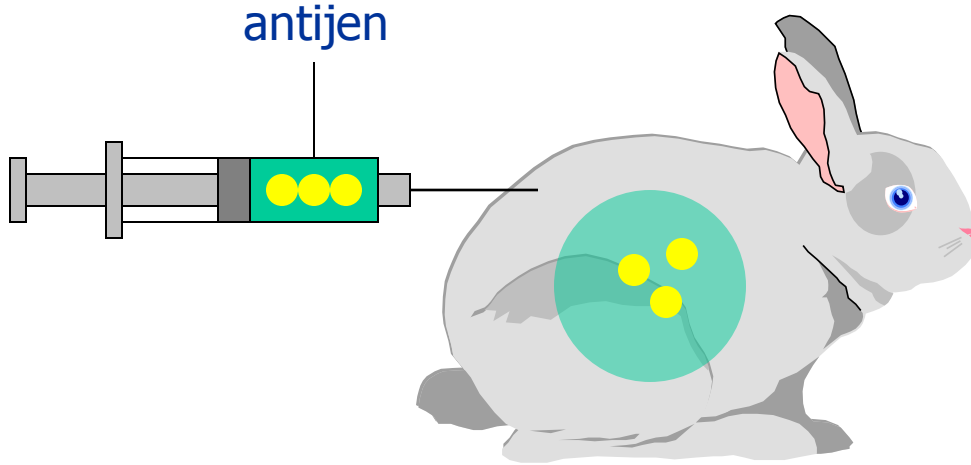
Poliklonal Antikor



Poliklonal antikorlar birçok epitopu tanıyabilir
Her bir antikor farklı B hücreleri tarafından üretilerek elde edilmiştir.

Poliklonal Antikor Üretimi

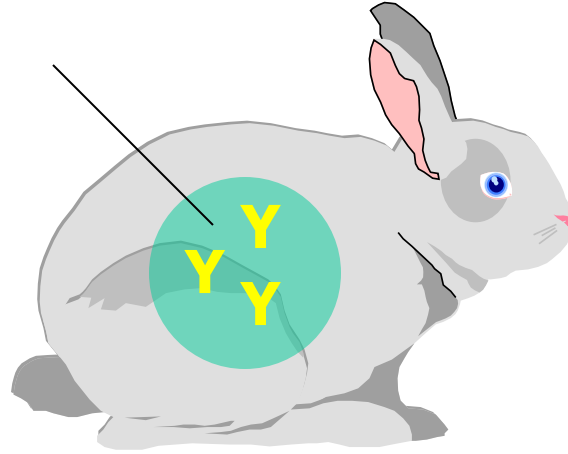
Poliklonal Antikor Üretimi



Tavşan (intradermal veya subkutan) saf antijen ile immunize edilir.

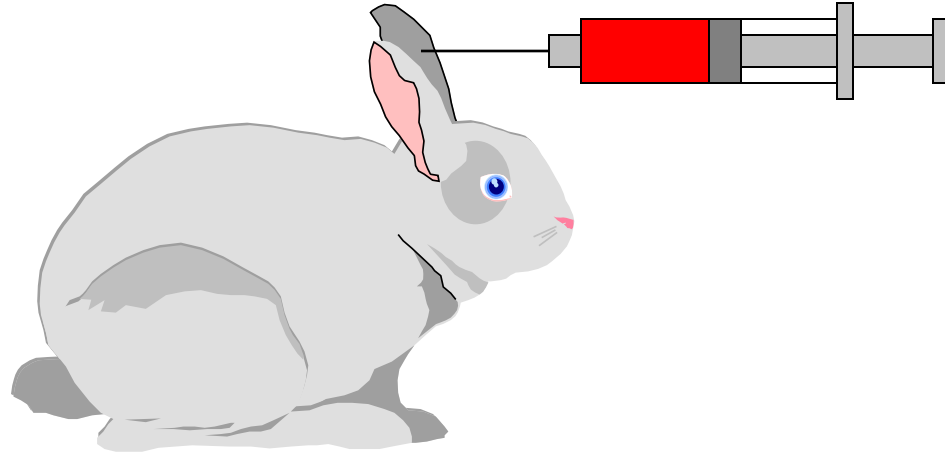
Poliklonal Antikor Üretimi

antikor



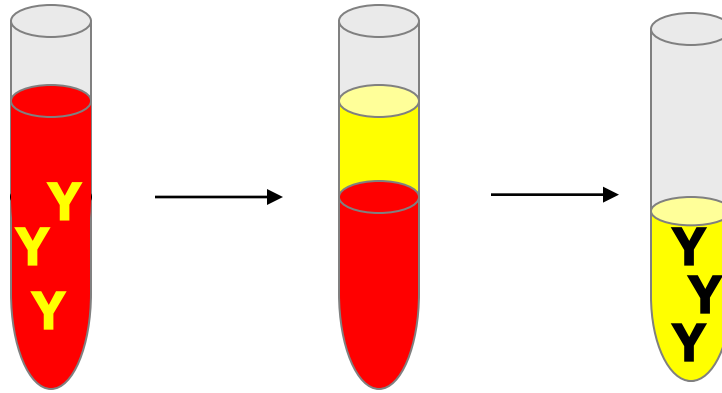
Tavşan immun sistemi verilen antijene karşı spesifik antikor üretir.

Poliklonal Antikor Üretimi



Tavşanın kanı alınır.

Poliklonal Antikor Üretimi



Eritrosit ve pıhtılaşma faktörleri uzaklaştırılarak antiserum elde edilir.

Poliklonal Antikor Üretimi

- ❑ Poliklonal antikorlar **Protein Purifikasyon** veya **Antijen Affiniti Kromatografisi** ile elde edilir.
- ❑ *Protein Purifikasyonu* serum proteinlerini elimine eder fakat non-spesifik immunglobulin fraksiyonlarını elimine edemez.
- ❑ *Antigen Affiniti Kromatografisi* edaha spesifik olup, non-spesifik immunglobulin fraksiyonlarını da elimine eder.

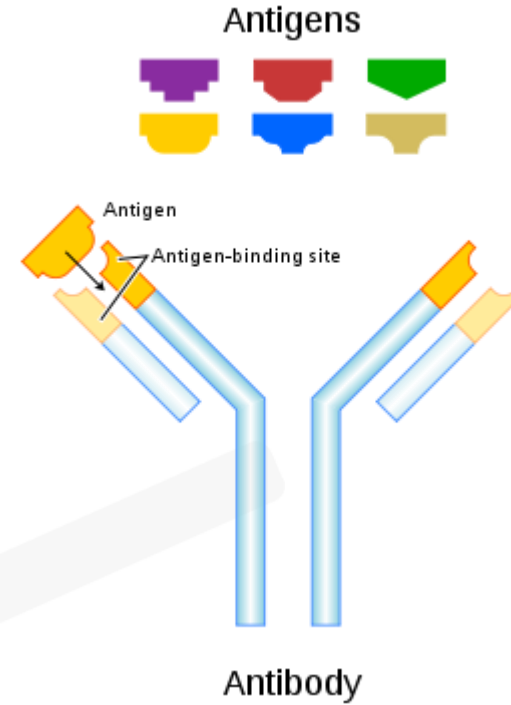
Monoklonal Antikorlar

Monoklonal Antikor

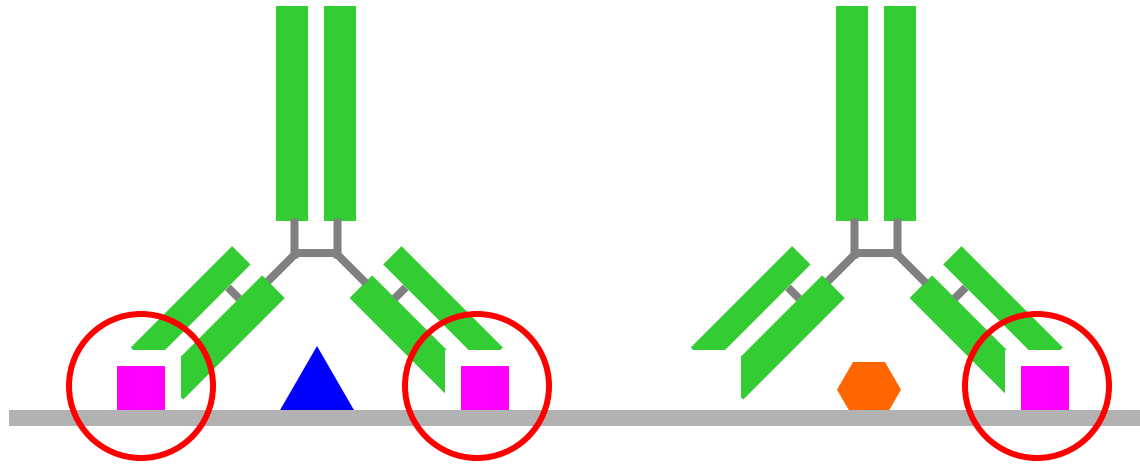
- ❑ **Monoklonal antikorlar** B hücrelerinden tek tip immunglobulin olarak elde edilirler.
- ❑ Daha sonra kültür ortamında fare myeloma hücreleri ile kaynaştırılarak hibrid hücreler elde edilir.
- ❑ Bunlar kültürde bölünür ve antikor oluştururlar.

Monoklonal Antikor

- Monoklonal antikorların en büyük avantajı antijene **özgün** oluşudur.



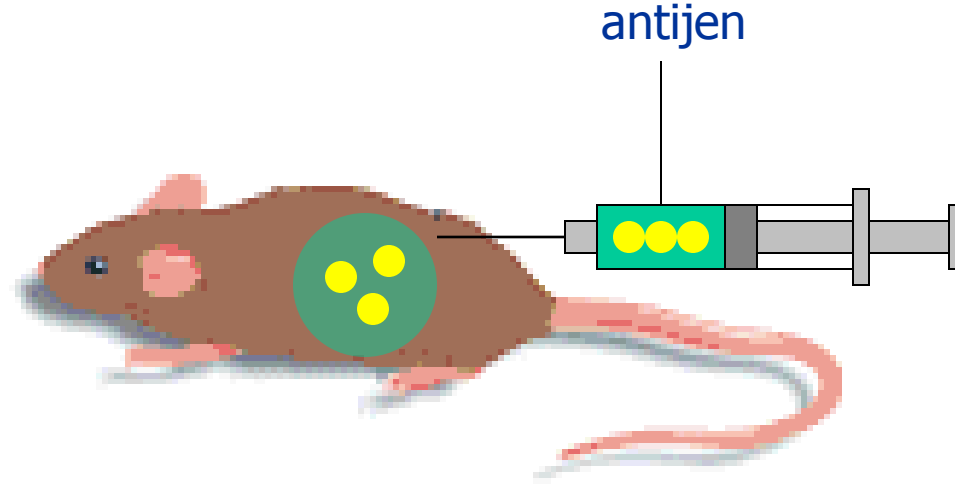
Monoklonal Antikor



Monoklonal antikor benzer epitoplara bağlanır.

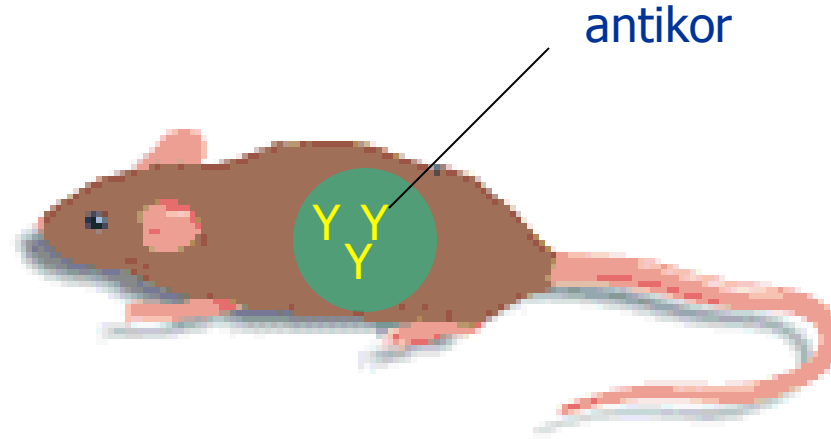
Monoklonal Antikor Üretimi

Monoklonal Antikor Üretimi



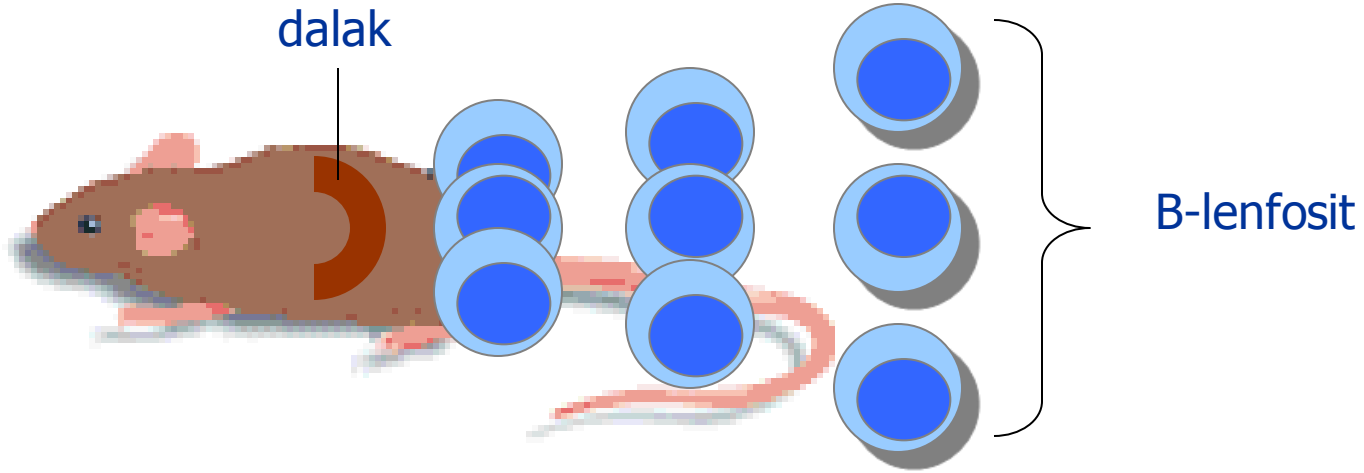
Fareye (intradermal veya subkutan) saf antijen verilir.

Monoklonal Antikor Üretimi



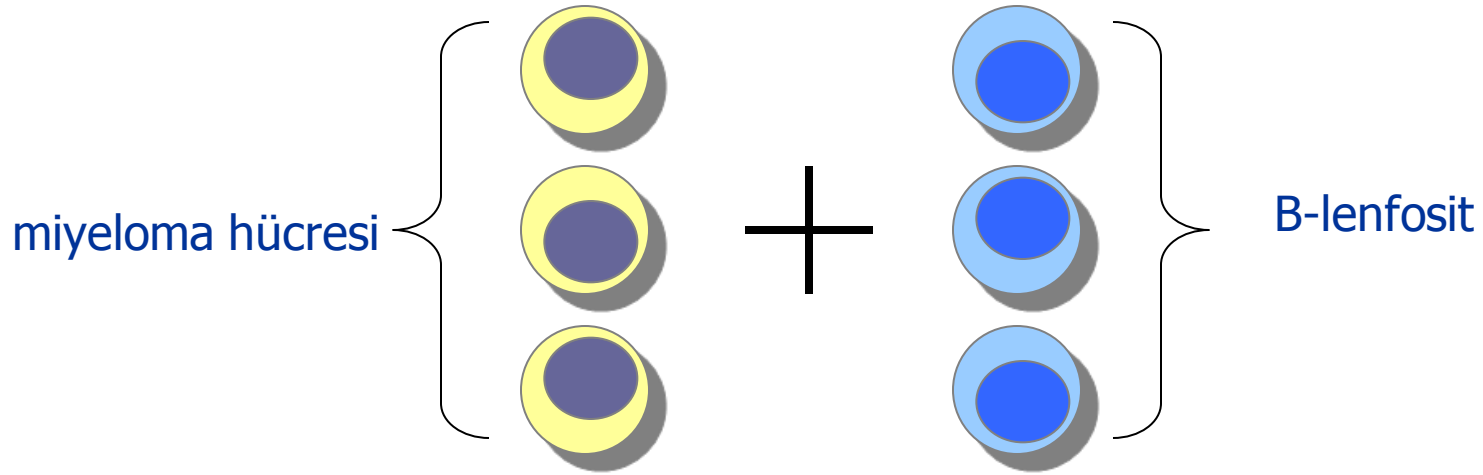
Fare immun sistemi antijene özgü antikor üretir.

Monoklonal Antikor Üretimi



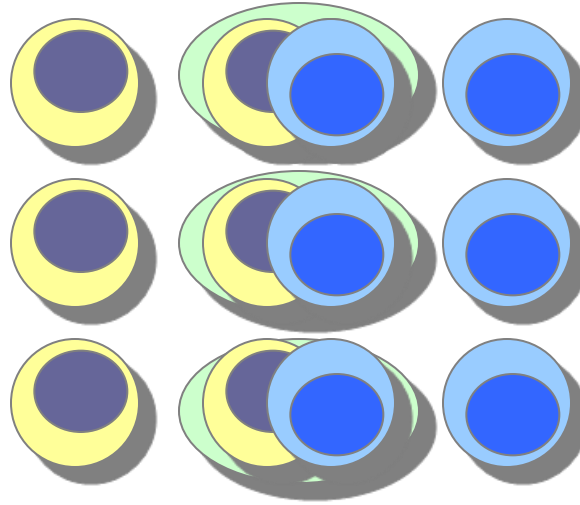
Antikor üreten B-hücreyi dalak veya lenf düğümünden elde edilir.

Monoklonal Antikor Üretimi



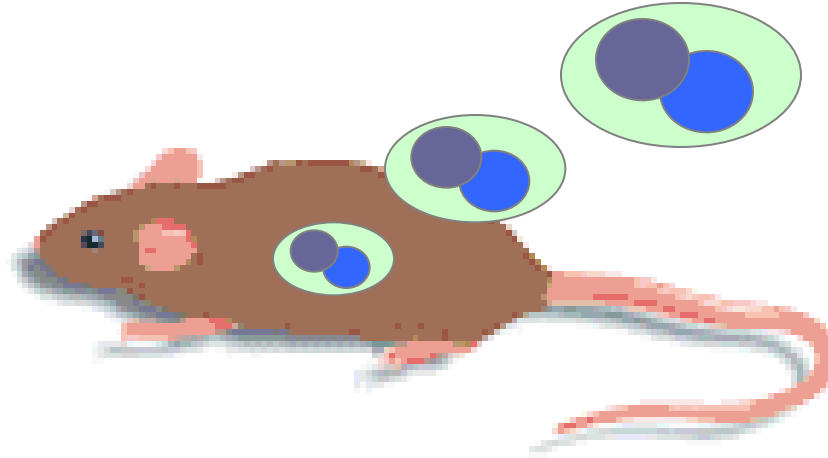
B hücresi miyeloma hücresi ile füzyonu sağlanır.

Monoklonal Antikor Üretimi



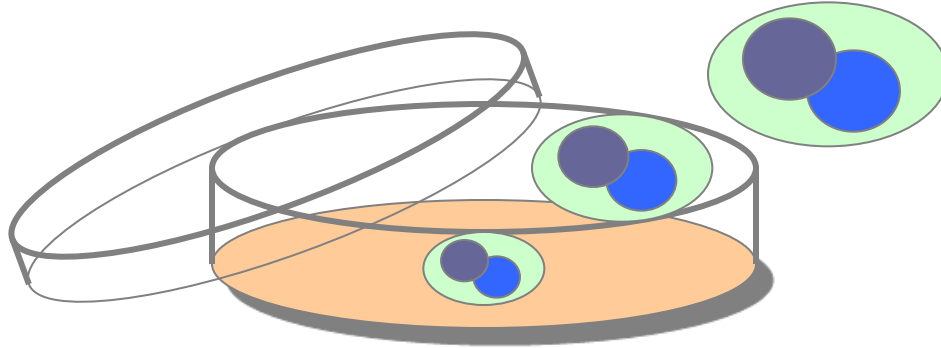
Hibridoma hücresi aynı özellikle antikor üretir.

Monoklonal Antikor Üretimi



Hibridoma hücresi ya peritoneal kaviyete transplante edilir ve peritoneal sıvıdan antikor elde edilir.

Monoklonal Antikor Üretimi

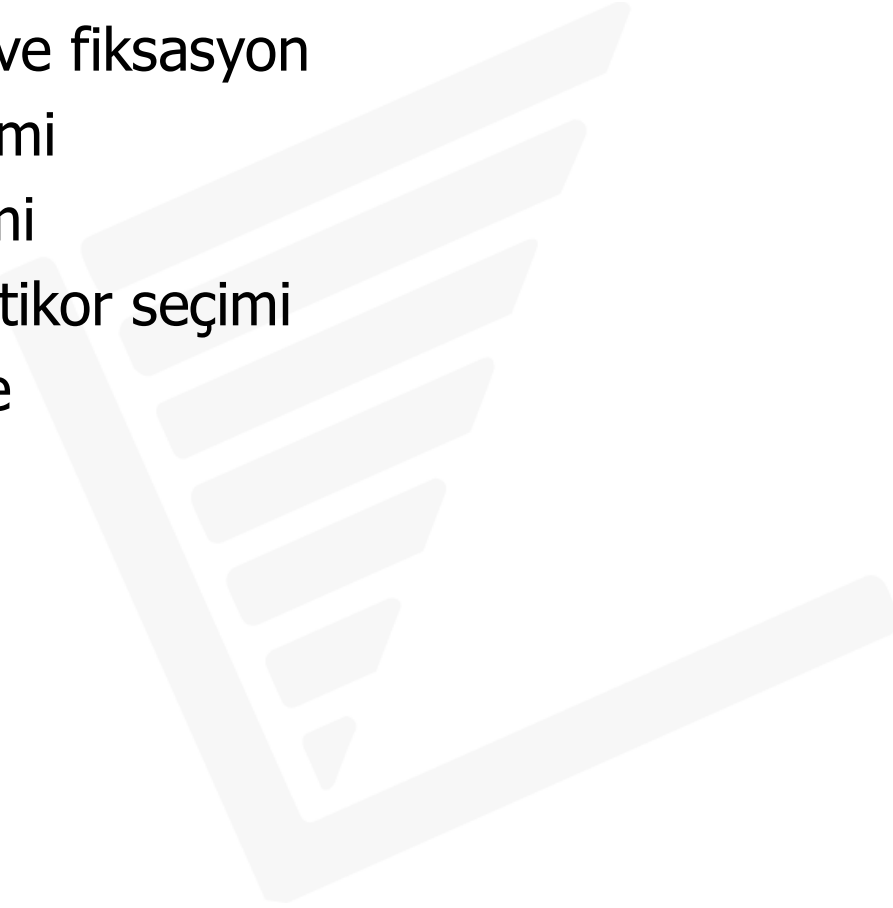


Yada hibirdoma hücresinin bulunduğu kültür vasatı toplanarak antikor olarak kullanılır.

İmmunohistokimya İçin Ön Hazırlık

Primer Antikorlar

- Doku eldesi ve fiksasyon
- Yöntem Seçimi
- Antikor seçimi
- Sekonder antikor seçimi
- Görüntüleme



Doku Eldesi ve Fiksasyon

❑ Doku Tipi : Taze doku veya hücre, Embriyo, Farklı tespit solüsyonu uygulanmış doku

❑ Fiksasyon

Ancak uygun olmayan veya uzamış fiksasyon antikor-antijen bağlanma yeteneğini önemli ölçüde **azaltır**.

Tüm antijenlerin uygulaması için ideal bir evrensel fiksatif yoktur.

Fiksatif seçimi sırasında kullanılacak antikor için belirlenmiş tespit yöntemi dikkate alınmalıdır.

- ❑ Otoliz ve ölümden sonra olabilecek değişiklikleri durdurmak,
- ❑ Doku elemanlarını canlı haldeki yapı ve pozisyonlarında tutmak ve korumak,
- ❑ Yumuşak olan doku örneklerini sertleştirerek daha sonraki doku takibi basamaklarında harap olmasını engellemek ve kesit alınmasını sağlamak,
- ❑ Sitoplazmanın yapısını yarı akışkan halden yarı katı hale getirmektir.

Fiksasyon

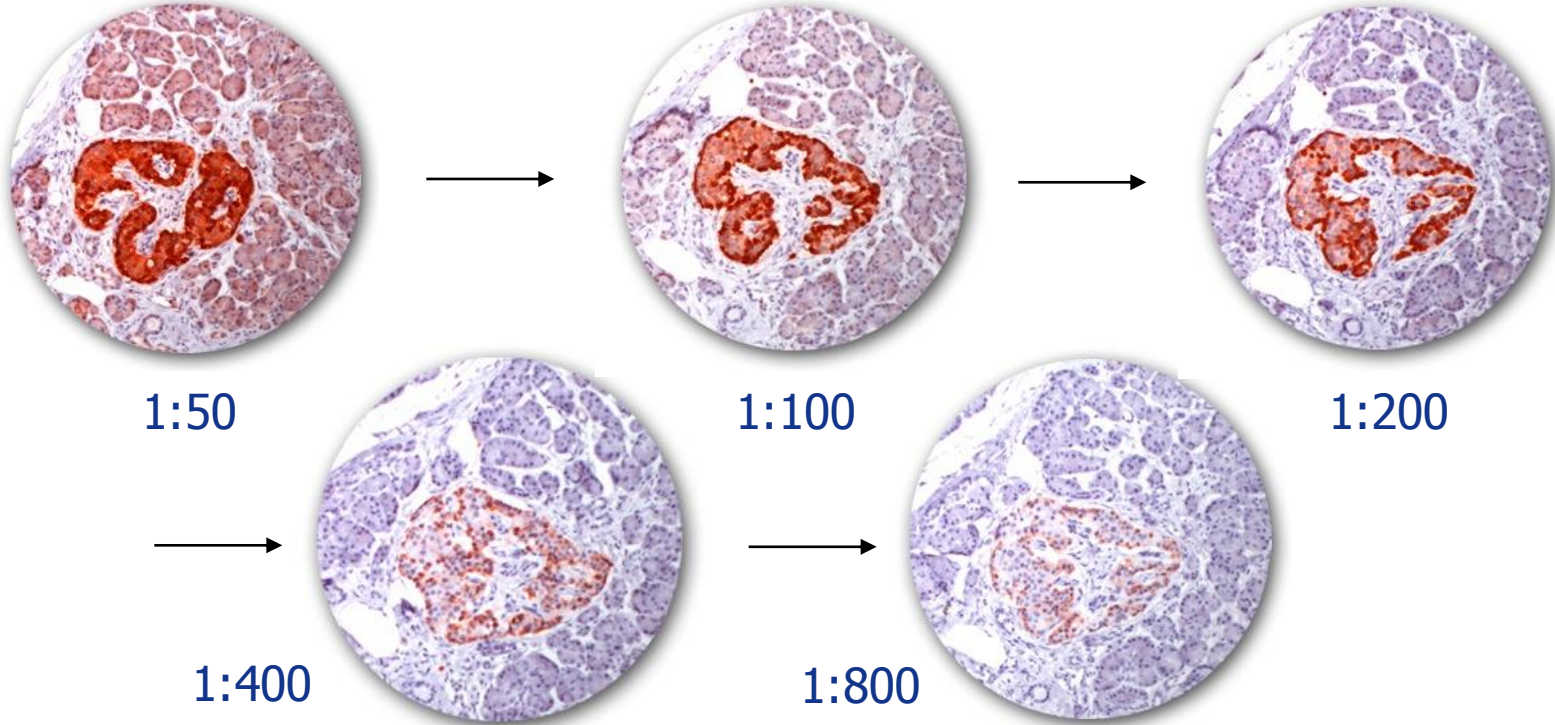
Fiksatif	Uygulama alanı	İnceleme	Avantaj	Dezavantaj
Formalin (% 10)	Parafin bloklar	Işık Mikroskobu	Doku hazırlığı iyidir.	Non spesifik boyama riski bulunmaktadır.
Paraformaldehit (% 4)	Frozen kesitler, Kültür hücreleri, Boyama sırasında post-fiksasyon	Işık ve Floresan Mikroskobu	Nonspesifik boyanma azdır.	Hücre yapısı korunmasında problemler olabilir.
Gluteraldehit (% 0.2-2.5)	Parafin bloklar, Epon yarı-ince veya ince kesitler	Elektron ve Işık Mikroskobu	Hücre yapısı çok iyi korunur.	Non spesifik boyama riski yüksektir.
Aseton, Metanol, Ethanol Karışımı (1/1)	Frozen kesitler, Paraformaldehit ile tespit edilen kesitlere postfiksasyon, kültür hücreleri	Işık ve Floresan Mikroskobu	Kültür hücrelerine birincil antikor girişi çok iyidir.	Hücre yapısı çok iyi korunamaz ve nonspesifik boyama riski yüksektir.

Permeabilizasyon

- Hücre içi antijen görünmesi istenir ise yapılır.
- Deterjan ve solventler kullanılır.
- Triton-X-100
- Tween-20
- NP-40
- Saponin
- Digitonin
- Brij-58

Primer Antikor ve Dilüsyonu

Dilüe veya Hazır kullanım (Ready to Use)



Primer Antikor ve Dilüsyonu

1:50

Langerhans Adacık
Hücreleri

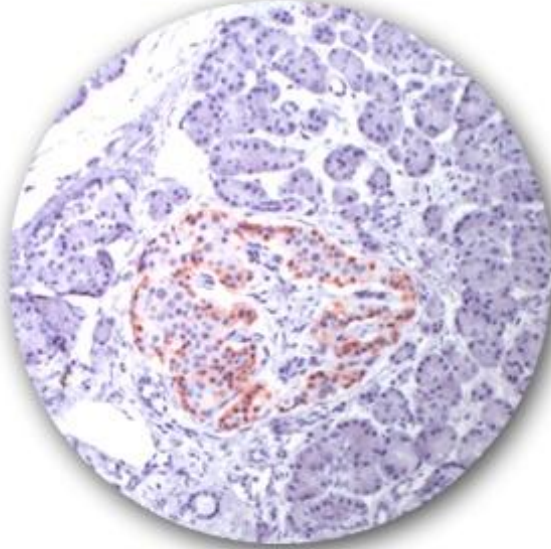


Arka plan boyanma

1:50, Langerhans adacık hücreleri koyu boyanmış, ama bununla beraber arka planda da hücreler boyanmış.

Primer Antikor ve Dilüsyonu

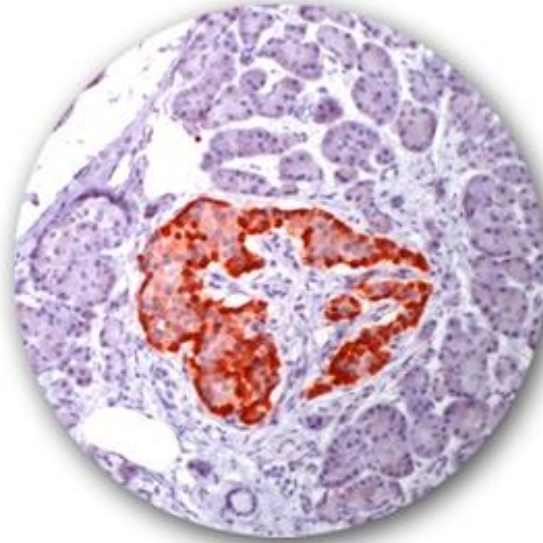
1:800



1:800, arka planda boyanma yok, fakat langerhans adacık hücreleride çok az boyanmış.

Primer Antikor ve Dilüsyonu

1:200



1:200, arka plan boyanma yok, langerhans adacık hücreleride spesifik boyanmış, ideal dilüsyon.

Antikörün İnkübasyon Süresi

İnkübasyon Zamanı

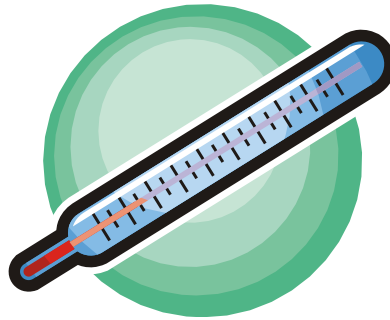
- ❑ Antikor konsantrasyonuna bağlıdır.
- ❑ Yüksek konsantrasyondaki antikor için daha kısa inkübasyon süresine ihtiyaç vardır.
- ❑ Sıcaklık düştükçe inkübasyon süresi artar.



Antikor İnkübasyonunda Sıcaklık

İnkübasyon Sıcaklığı

- ❑ Antikor-antijen reaksiyonu 37°C de oda sıcaklığına göre daha hızlıdır.
- ❑ Sıcaklığın artması ile daha yüksek konsantrasyonda antikora ihtiyaç duyulur.
- ❑ Sıcaklığın artması ile ayrıca nemli ortam ihtiyacında artar.



Antijenin Gösterilmesi

Antijenin Gösterilmesi

- ❑ Fiksasyon sırasında birçok antijenik bölge kapanır ve bu gibi durumlarda antijenin gösterilebilmesi için ek bir basamağa ihtiyaç vardır.
- ❑ **Antijen Retrieval** örneğin parafin bloklar proteolitik enzimler ile ve/veya yüksek sıcaklıkta farklı tampon solüsyonları içinde inkübasyon gerekir.

Antijen Retrieval

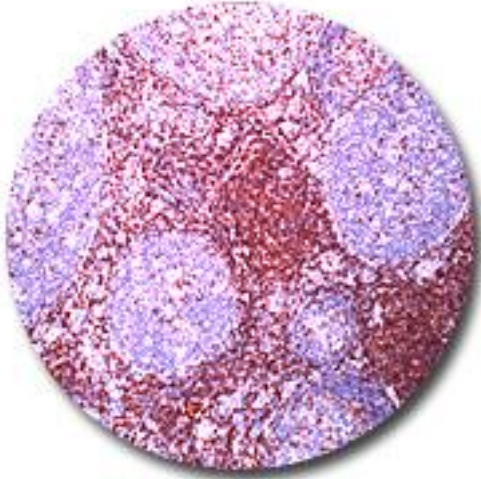
□ Heat induced epitope retrieval (HIER)

- Mikrodalga Fırın, düdüklü tencere, buharlı tencere, otoklav ve su banyosu kullanılabilir.
- 20 dakika ısıtma- 20 dakika soğutma
- Sitrat tampon solüsyonu pH 6.0
- Tris-EDTA pH 10.0
- EDTA pH 8.0

□ PIER (Proteolytic Induced Epitope Retrieval)

- Proteinaz K
- Tripsin
- Kemotripsin
- Pepsin
- Pronaz

Antigen Retrieval



Sitrate solüsyonu, pH 6.0



No Antijen Retrieval

Tonsilla Palatina, CD3 immunohistokimyası

Enzim ve Kromojenler

Enzim ve Kromojenler

- ❑ Antijen-antikor kompleksini görünür hale getirmek için gereklidir.

- ❑ **Enzim** sıklıkla kullanılanlar
 - horseradish peroxidase (HRP)
 - alkaline phosphatase (AP)

- ❑ **Kromojen** sıklıkla kullanılanlar
 - 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)
 - 3,3'-diaminobenzidine (DAB)

İmmunofloresan

- ❑ Bu yöntemde enzim- substrat ilişkisi yerine aynı işlevi göre fluoresans maddeler kullanılır.
- ❑ İdeal floresan madde yüksek oranda kısa dalga ışınlarını arbsorblayabilmelidir.

FITC (Fluorescein isothicyanate)

Rodamin: TRITC (Tetrametilrhodmine isothiyocyanate)

Fikoeritrin (PE)

Akridin orange (AO)

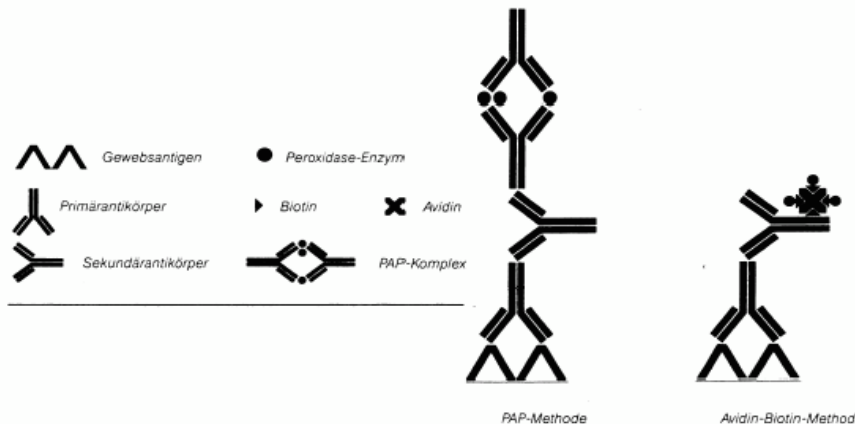
Floresan mikroskopta , antikorlara bağlı bu maddeler için uygun filtreler kullanılarak işaret **yeşil**, **kırmızı** veya **mavi** renklerde gözlenir.

İmmunogold Yöntemi

- ❑ İmmun altın yönteminde işaret maddesi olarak antikora **kolloidal altın partikülleri** bağlanır.
- ❑ İmmun işaret , gümüş tuzlarıyla yapılan bir redüksiyon işlemiyle altın partiküllerinin gümüş metali ile kaplanarak alınır.
- ❑ Işık mikroskopunda kullanılan immün işaretleme yöntemi çalışılan doku ve kullanılacak antikora göre seçilir

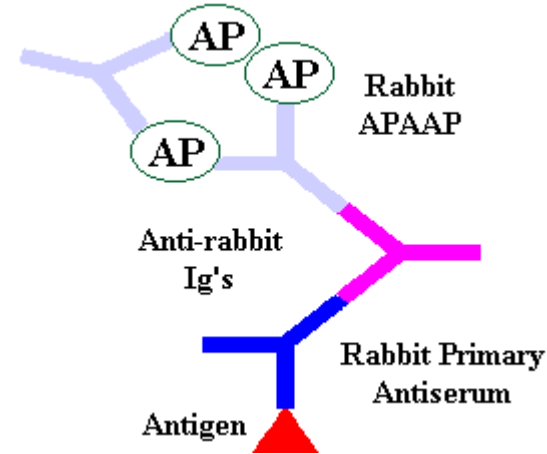
Peroksidaz anti Peroksidaz Yöntemi

- ❑ PAP yöntemi indirekt tekniklerin daha gelişmişidir ve PAP kompleksi oluşturmak için peroksidaz ile birleşmiş, peroksidaz için tavşan antikoru içeren üçüncü bir basamak içerir.
- ❑ Biotin-Avidin yönteminde ise avidin biotine spesifik olarak bağlandığından dolayı sekonder antikor olarak hazırlanan biotinlenmiş antikor üzerine streptavidin uygulanması ile reaktivite sağlanır.



Alkalen Fosfataz anti alkalen fosfataz

- ❑ Enzim: Alkalen fosfataz kullanılması dışında PAP yöntemi ile hemen hemen aynıdır.
- ❑ Sekonder antikora bağlanmış olan alkalen fosfataz-anti alkalen fosfataz kompleksi mevcuttur.
- ❑ Bu yöntemde de substrat enzim reaksiyonu sonucu doku antijeni belirlenir.



Avidin-Biotin Kompleks

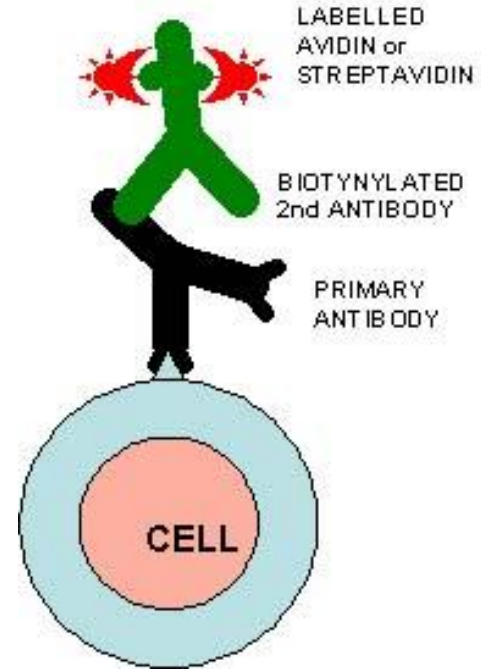
□ Bu teknik üç basamak içerir.

1- İşaretsiz primer antikor

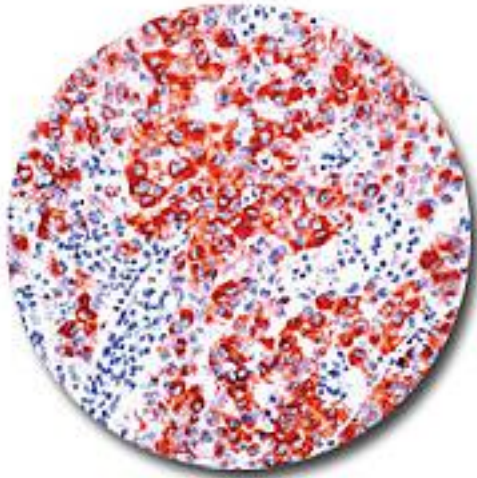
2- Biotinlenmiş ikincil antikor

3- Avidin-biotin peroksidaz kompleksi

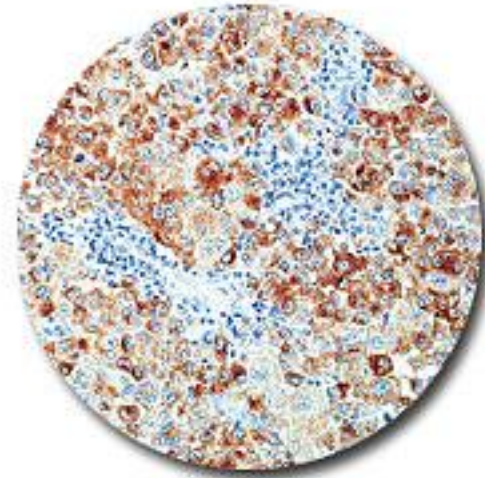
Peroksidaz DAB yada diğer substrat tarafından farklı kolorimetrik son ürünler ile görünür hale getirilir.



AEC ve DAB Boyamaları



AEC kromojen
Mart-1
Melanoma



DAB kromojen
Mart-1
Melanoma

Immunohistokimya Protokolü

İmmunohistokimya Protokolü

- ❑ Direkt Yöntem
- ❑ İki-Basamaklı İndirekt Yöntem
- ❑ Üç-Basamaklı İndirekt Yöntem
- ❑ Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Yöntem
- ❑ Alkaline-Antialkaline Phosphatase (APAAP) Yöntem
- ❑ Avidin-Biotin Kompleks (ABC) Yöntemi
- ❑ İşaretlenmiş Streptavidin-Biotin (LSAB) Yöntemi

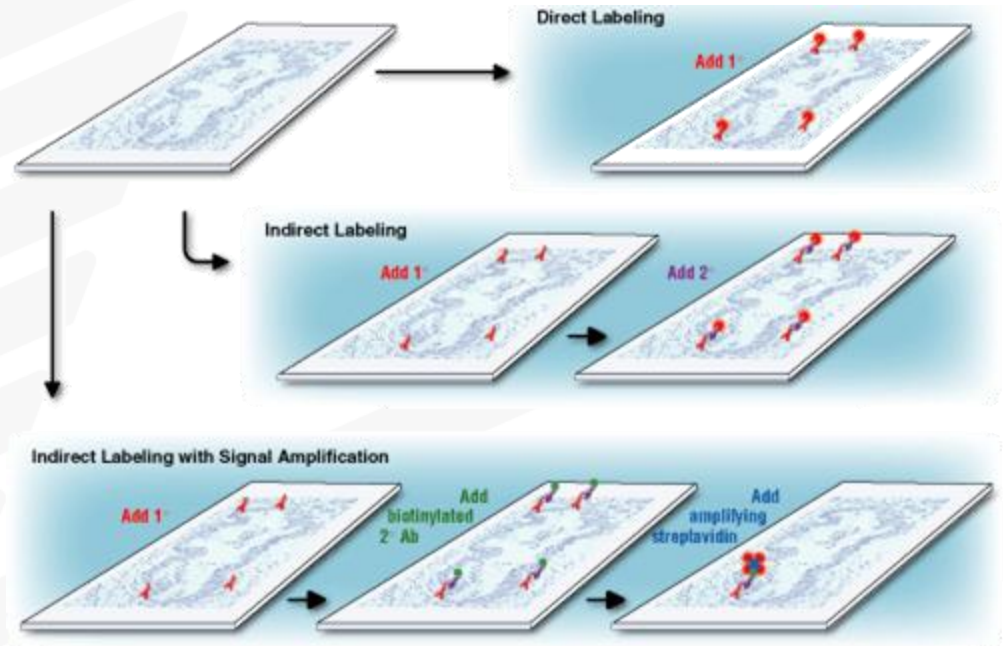
İmmunohistokimya Protokolü

- ❑ Blok Serum Uygulaması
 - Non-spesifik boyama normal serum ile azaltılabilir.
 - Temel neden: Doku kesitlerinin belirli yerlerinde hidrofobik ve elektrostatik kuvvetler tarafından spesifik immun serumun non-immunolojik bağlanmasıdır.
- ❑ Endojen peroksidaz aktivitesinin kaldırılması
 - Doku peroksidazını inhibe etmek için kullanılır.
 - Hidrojen peroksit
- ❑ Endojen alkalen fosfataz aktivitesinin kaldırılması
 - Levamizol

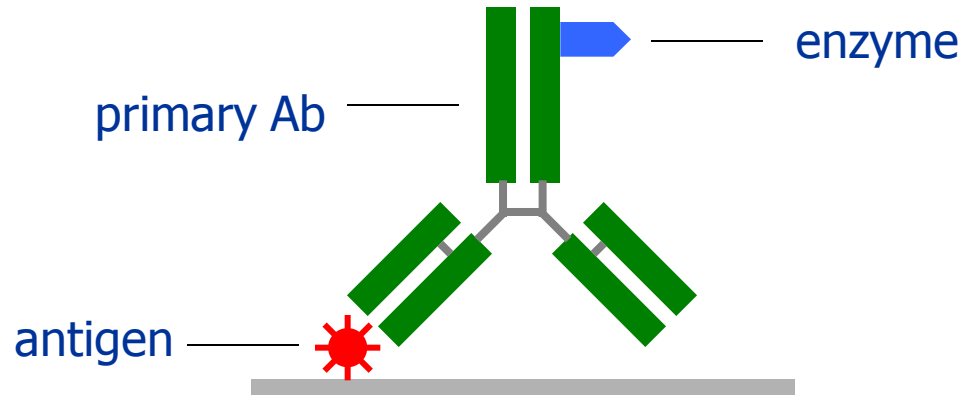
Direkt Yöntem

Direkt Yöntem

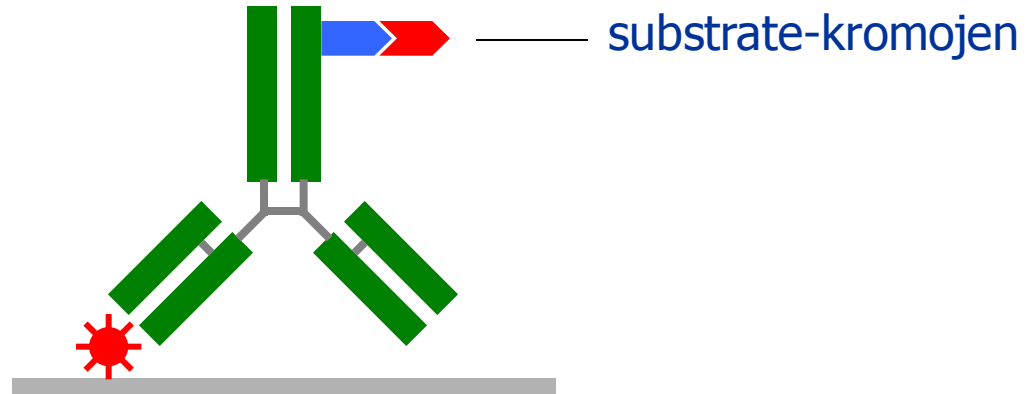
- ❑ Enzim-işaretli primer antikor kullanılır.
- ❑ Horseradish peroxidase (HRP) veya alkaline phosphatase (AP)
- ❑ Spesifikliđi daha azdır.



Direkt Yöntem



Enzim içeren antikor konur.

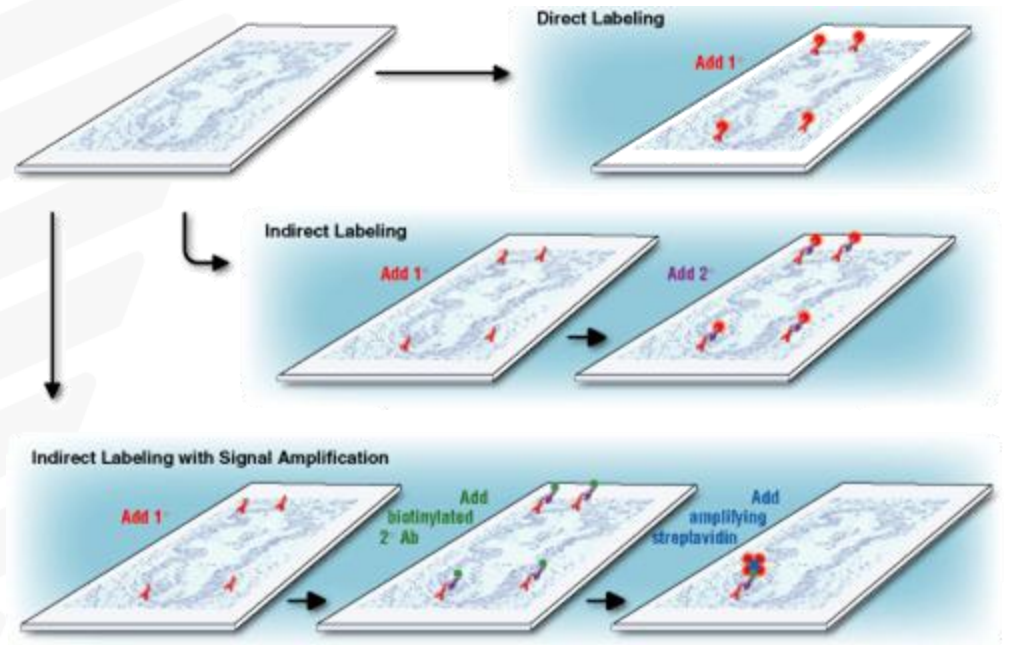


Kromojen içeren solüsyon ilavesi yapılır.

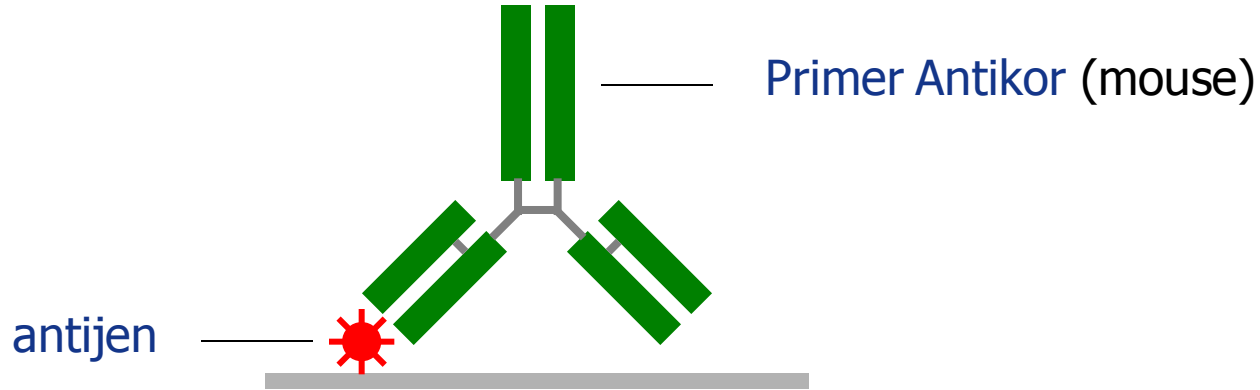
İki-Basamaklı İndirekt Yöntem

İki-Basamaklı İndirekt Yöntem

- ❑ Enzim-işaretli ikinci antikor kullanılır.
- ❑ Primer antikor işaretli değildir.
- ❑ Primer antikorun üretildiği kaynak ile sekonder antikor uyumlu olmalıdır.
- ❑ Direkt yöntemden daha spesifiktir.

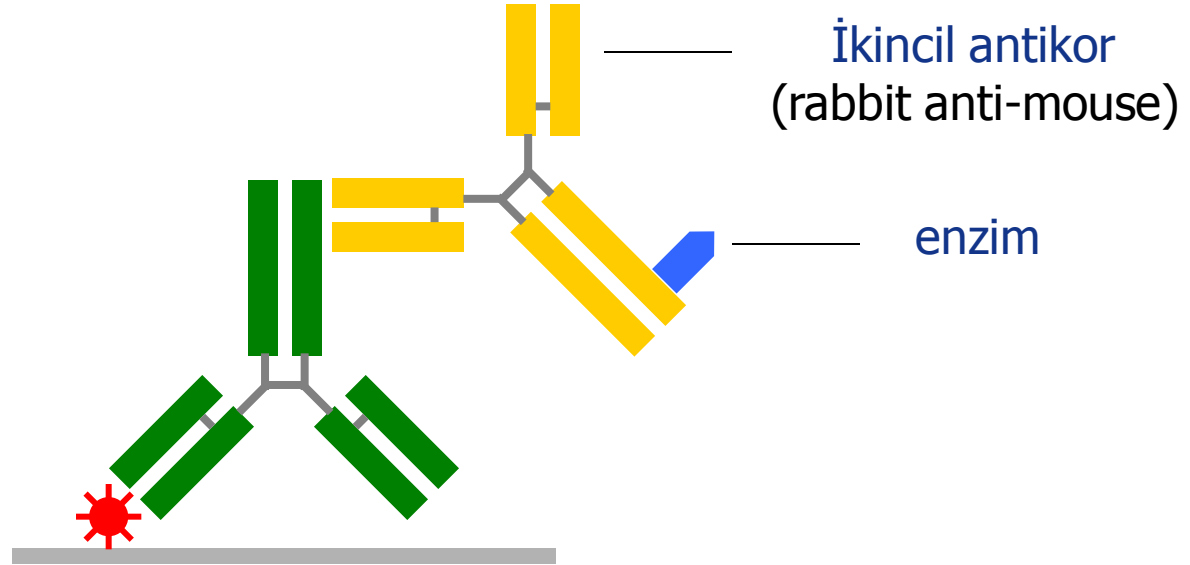


İki-basamaklı İndirekt Yöntem



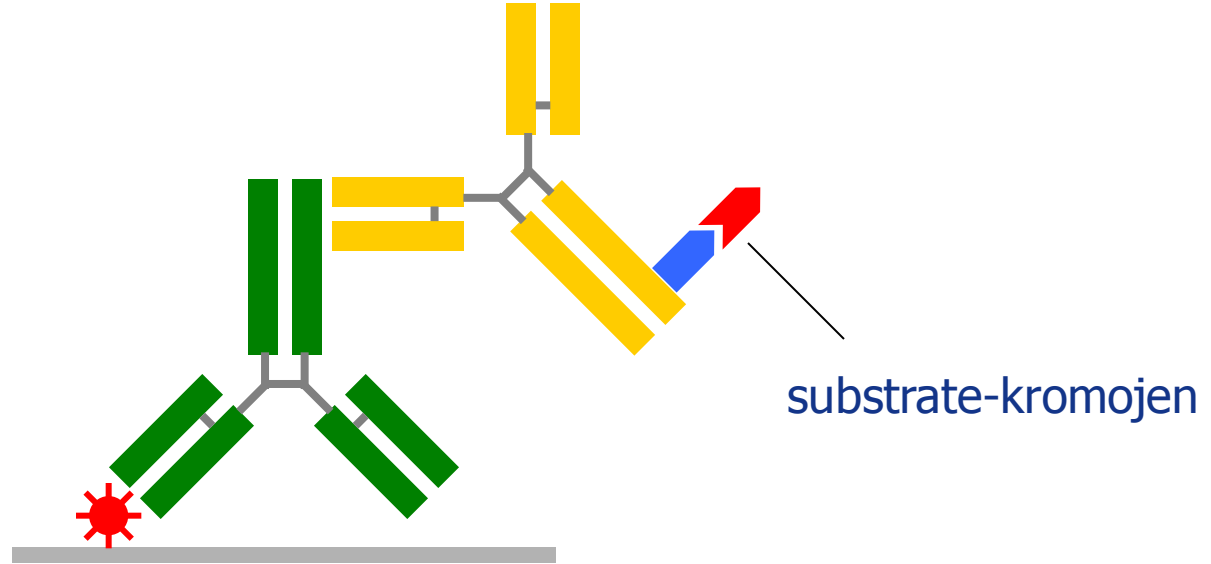
İşaretlenmemiş primer antikor uygulanır.

İki-basamaklı İndirekt Yöntem



Enzim ile işaretli primere uyumlu ikincil antikor uygulanır.

İki-basamaklı İndirekt Yöntem



Son ürünü renk veren kromojen kullanılır.

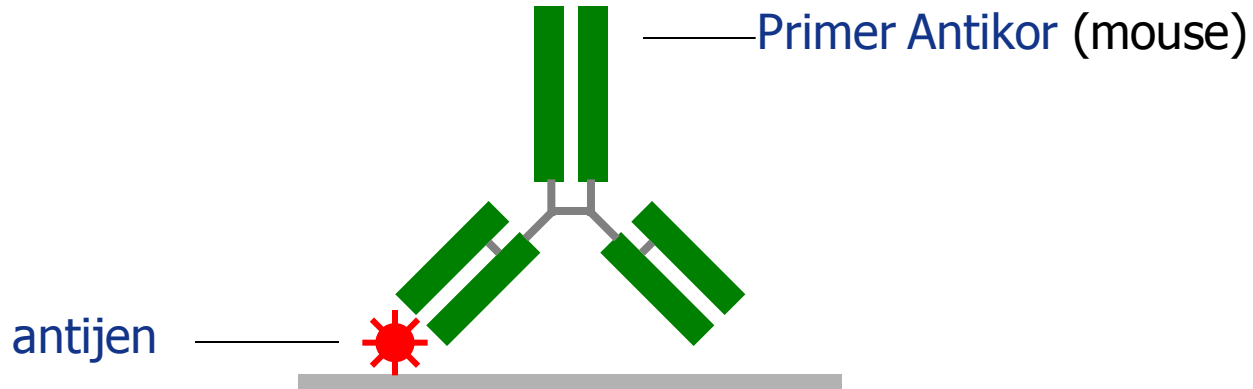
Üç-Basamaklı İndirekt Yöntem

Üç-basamaklı İndirekt Yöntem

- ❑ İki-basamaklı İndirekt Yöntemden farklı olarak **enzim-işaretleli üçüncül antikor** kullanımı vardır.
- ❑ Spesifite daha güçlüdür.
- ❑ Hem ikincil hemde üçüncül antikor aynı enzim ile konjuge edilmiş olmalıdır.

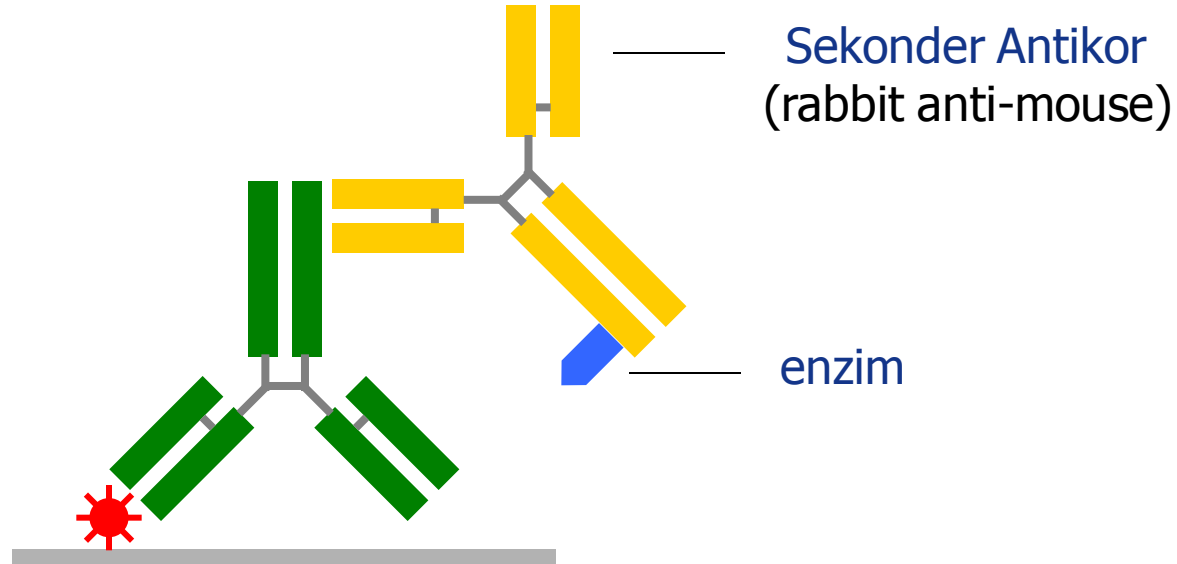
Üç-basamaklı İndirekt Yöntem

İşaretlenmemiş primer antikor ilave edilir.



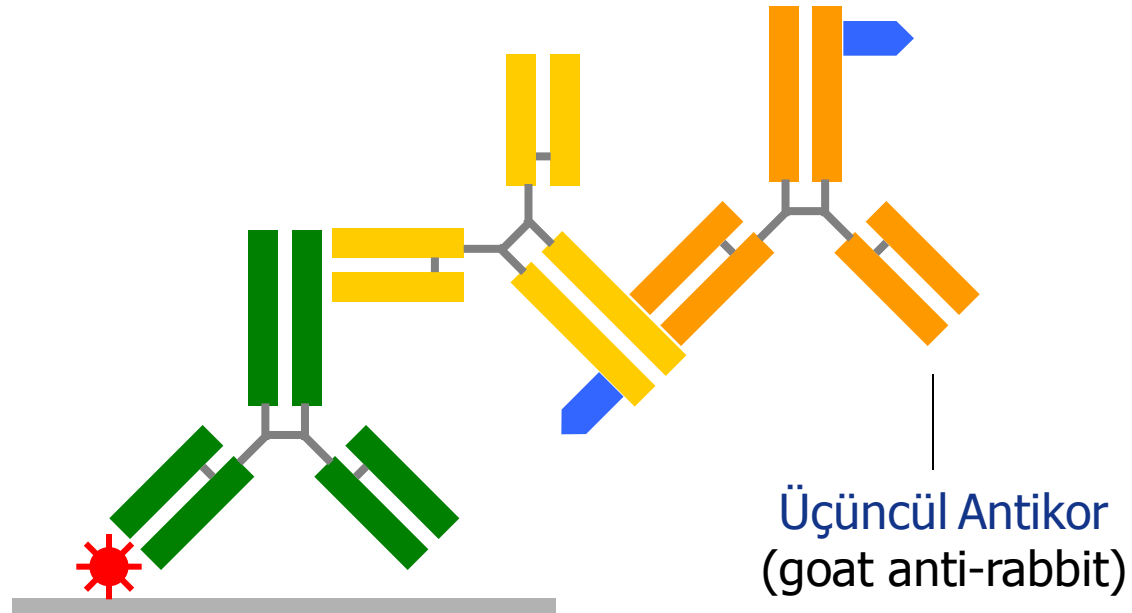
Üç-basamaklı İndirekt Yöntem

Enzim işaretli ikincil antikor ilave edilir.



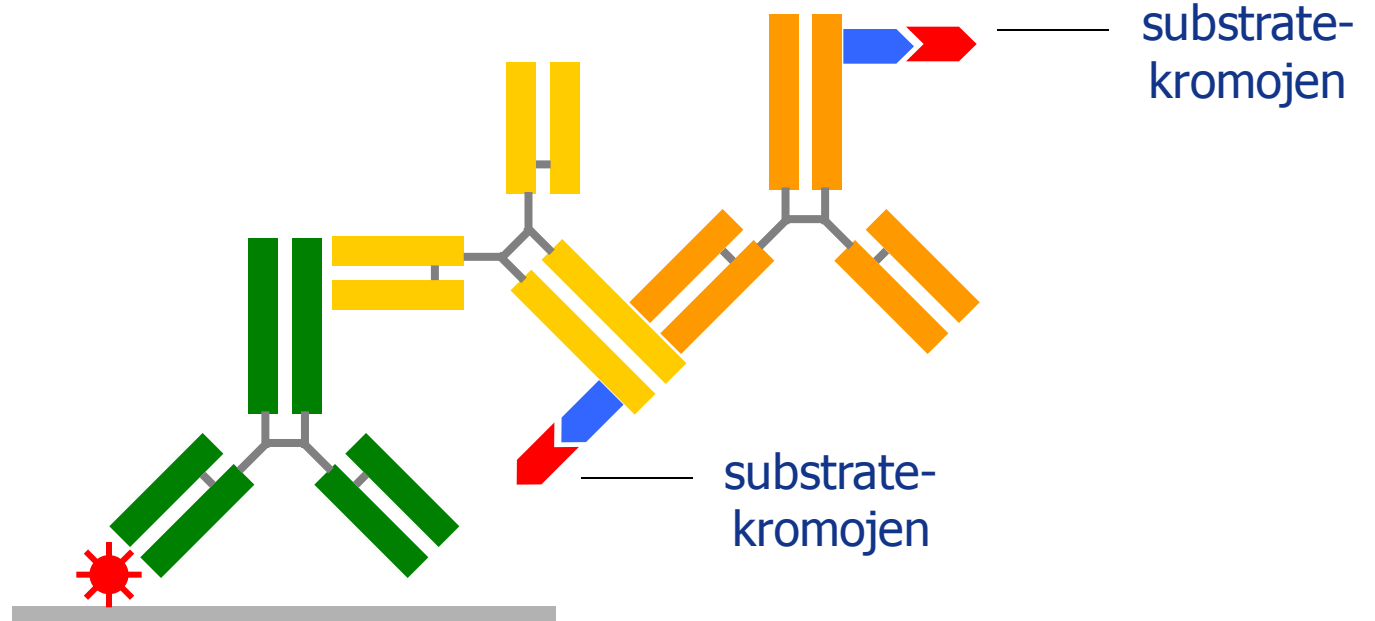
Üç-basamaklı İndirekt Yöntem

İkincil antikora bağlanan enzim işaretli üçüncül antikor ilavesi edilir.



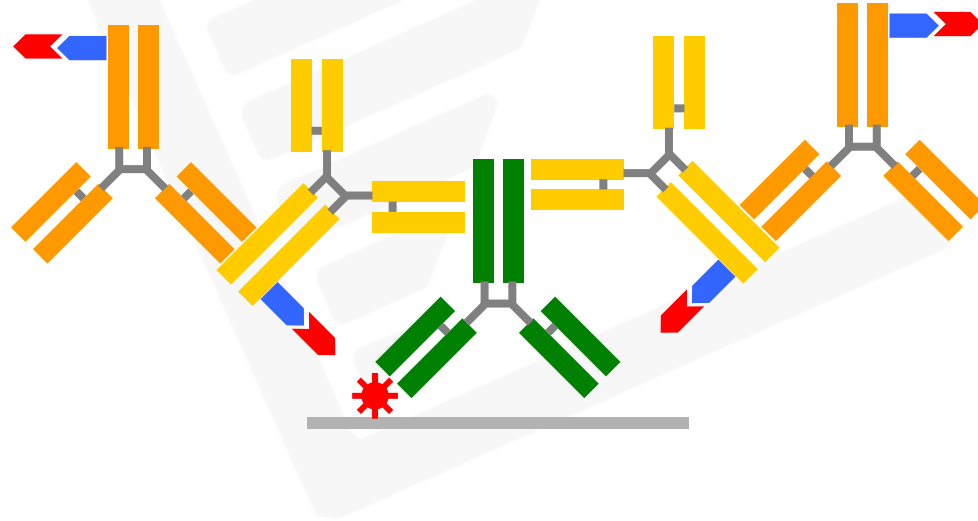
Üç-basamaklı İndirekt Yöntem

Kromojen ilavesi edilir.



Üç-basamaklı İndirekt Yöntem

- Birden fazla sekonder ve ikincil antikor bağlantısı gerçekleştiğinden elde edilen boyanma daha spesifiktir.



Avidin-Biotin Yöntemi

- ❑ **Avidin** (yumurta beyazı glikoproteini) **biotin** (suda çözünen vitamin) bağlanma özelliğinden yola çıkılarak uygulanmıştır.
- ❑ Avidin biotin için 4 bağlanma bölgesine sahiptir.



Avidin-Biotin Yöntemi

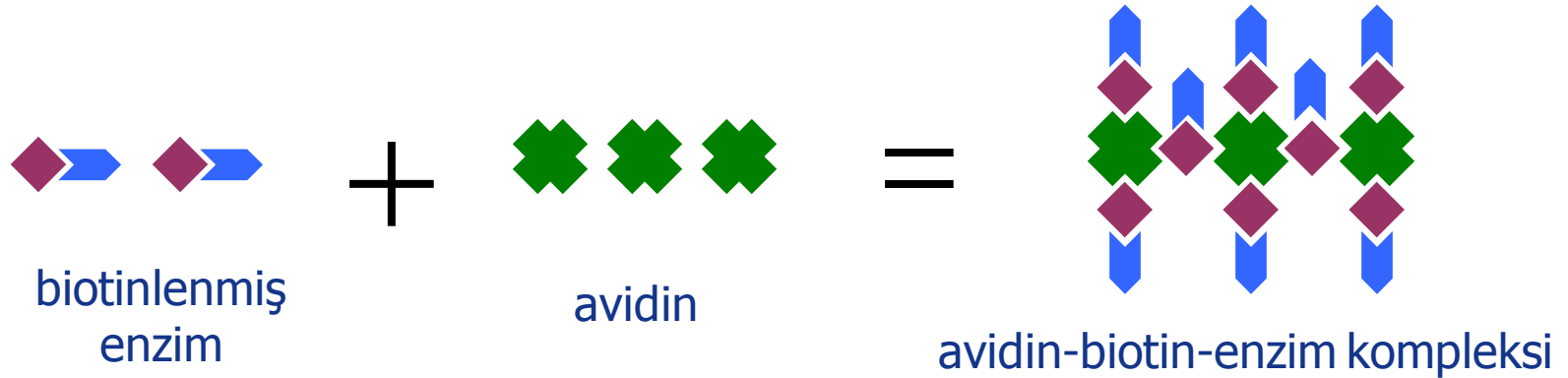
- ❑ En sık kullanılan iki yöntem vardır
 - Avidin-Biotin enzyme Complex (ABC)
 - Labeled StreptAvidin-Biotin (LSAB)

- ❑ Spesifikliđi daha fazla olduđu için *PAP* veya *APAAP* yöntemlerine tercih edilir.

- ❑ **Streptavidin**, bakterial proteindir, daha az nonspesifik byanma yaptığından avidin yerine kullanır.

ABC Yöntemi

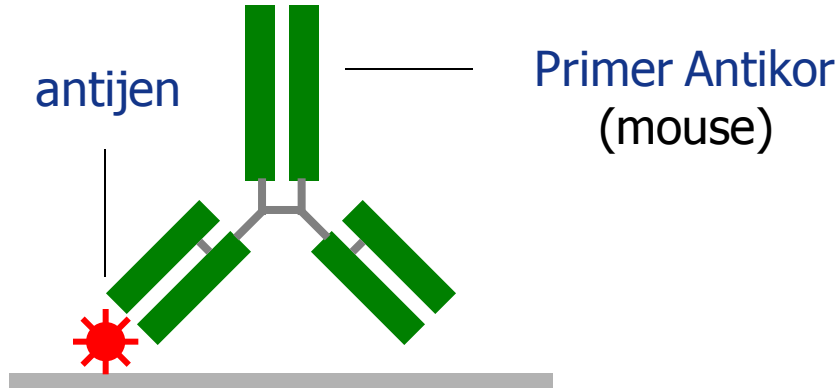
- Enzim kompleksi biotinlenmiş enzim (HRP or AP) ve avidindir.



- Avidin-biotin-enzim kompleksi biotinlenmiş ikincil antikor ile bağlanır.

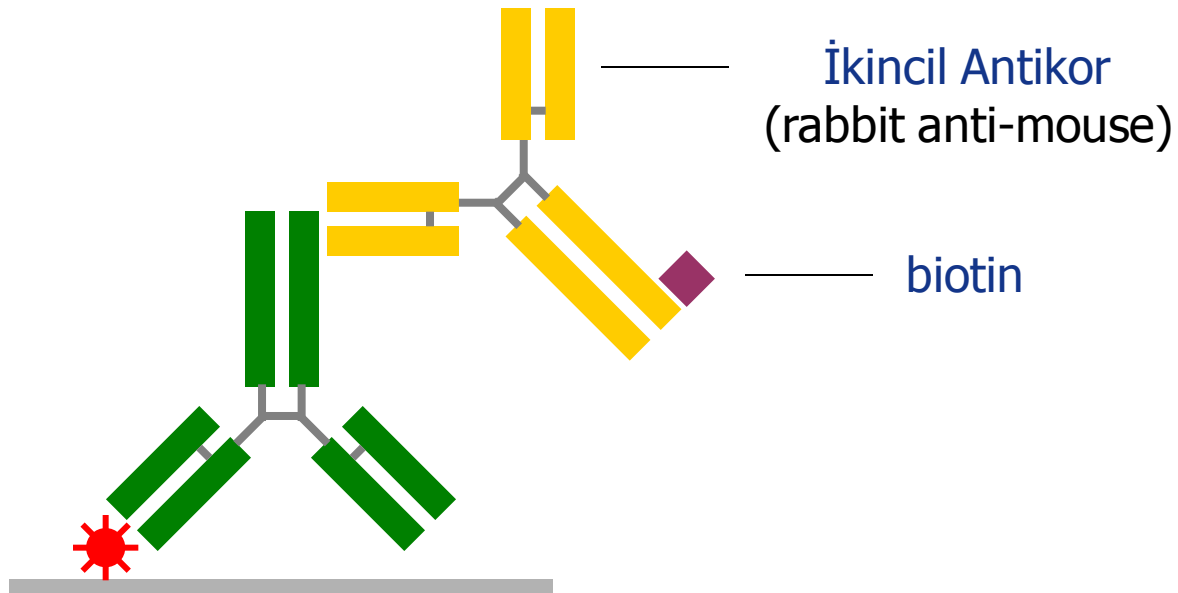
ABC Yöntemi

İşaretlenmemiş birincil antikor ilavesi yapılır.



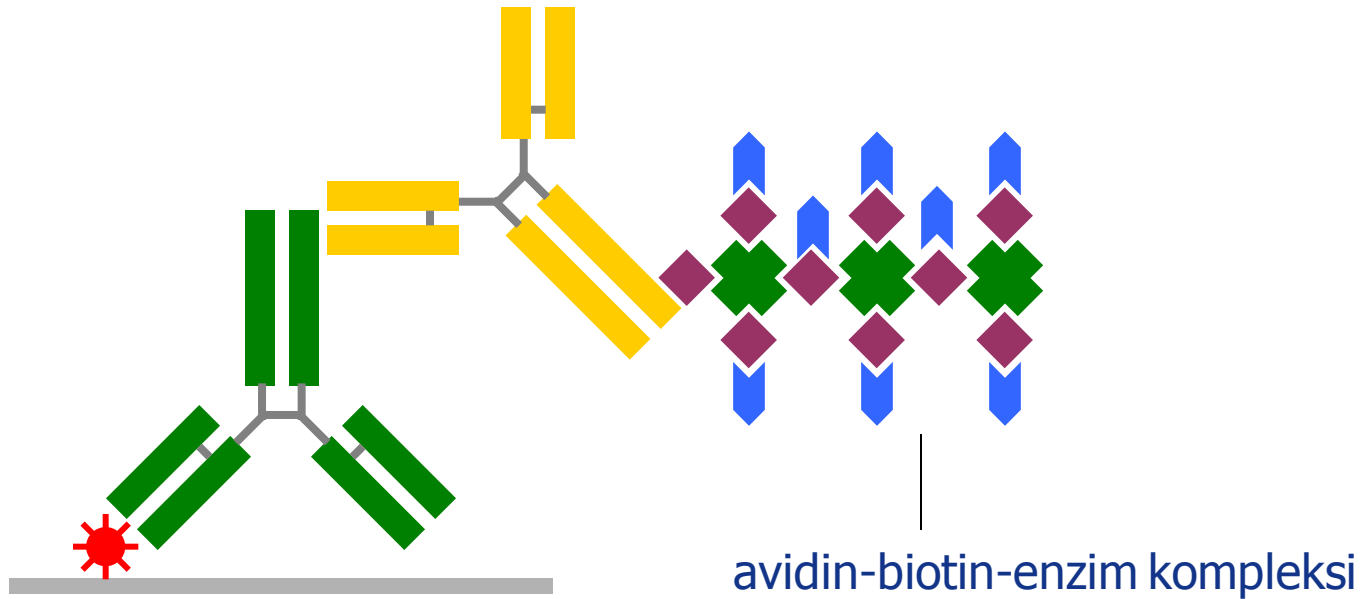
ABC - Procedure

Biotinlenmiş ikincil antikor primer antikora bağlanır.



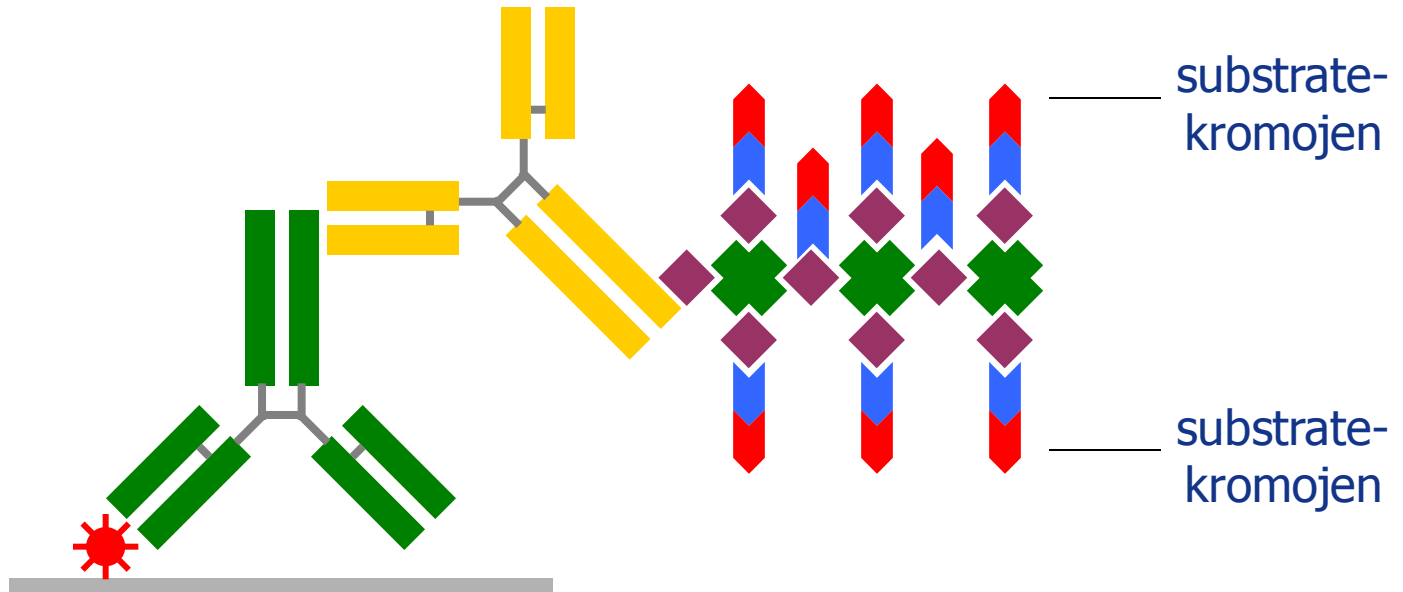
ABC Yöntemi

Avidin-biotin-enzim kompleksi ilave edilir ve biotinlenmiş ikincil antikora bağlanır.



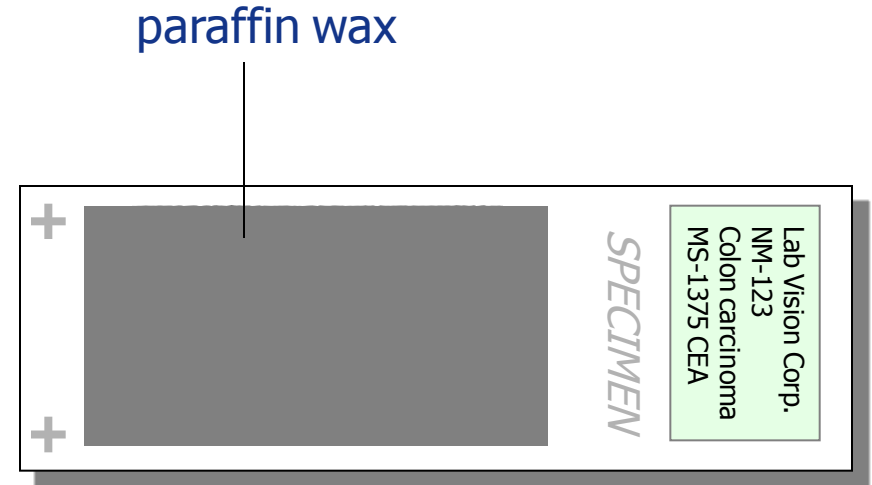
ABC Yöntemi

Kromojen solusyonu en sonda ilave edilir.



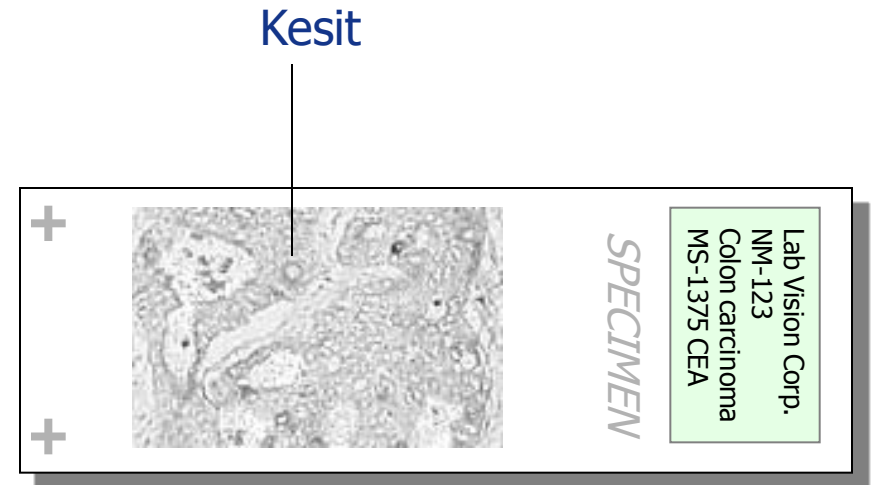
Örnek Protokol

— Deparaffinizasyon ve Rehidrasyon



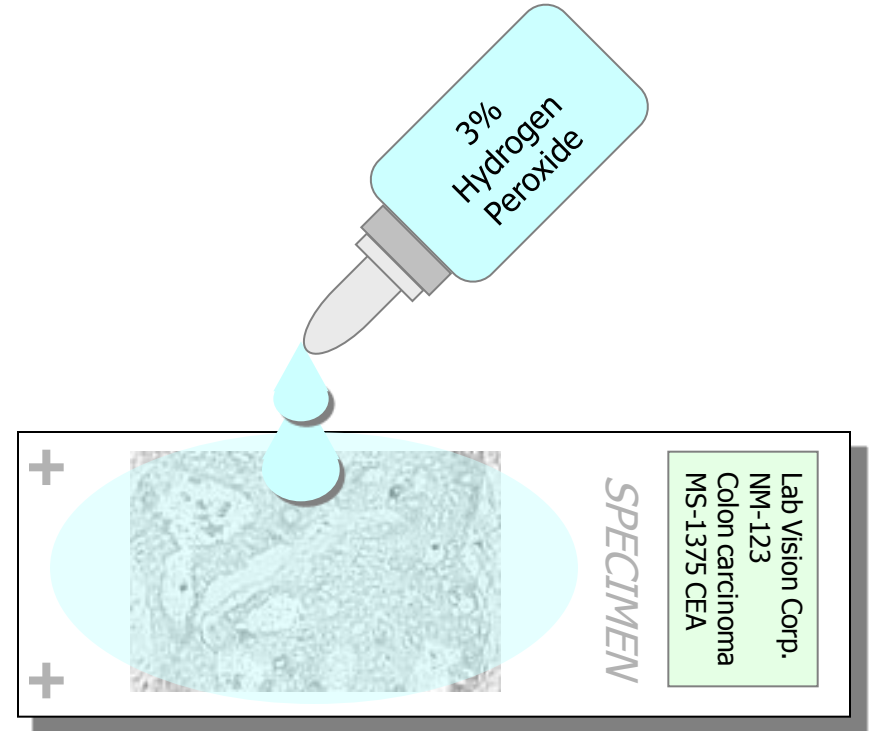
Parafin kesitteki parafin uzaklaştırılmalıdır.

— Deparaffinizasyon ve Rehidrasyon



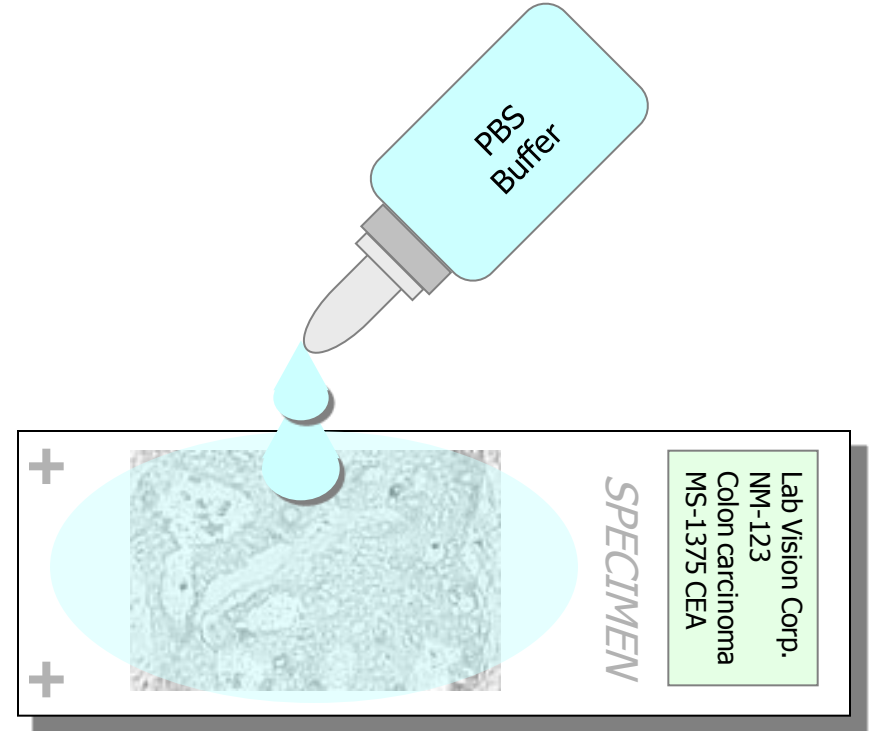
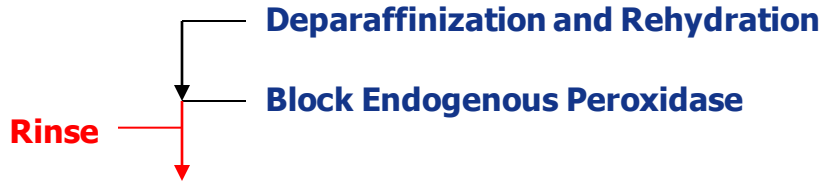
Örnek Protokol

Deparaffinization and Rehydration
Block Endogenous Peroxidase



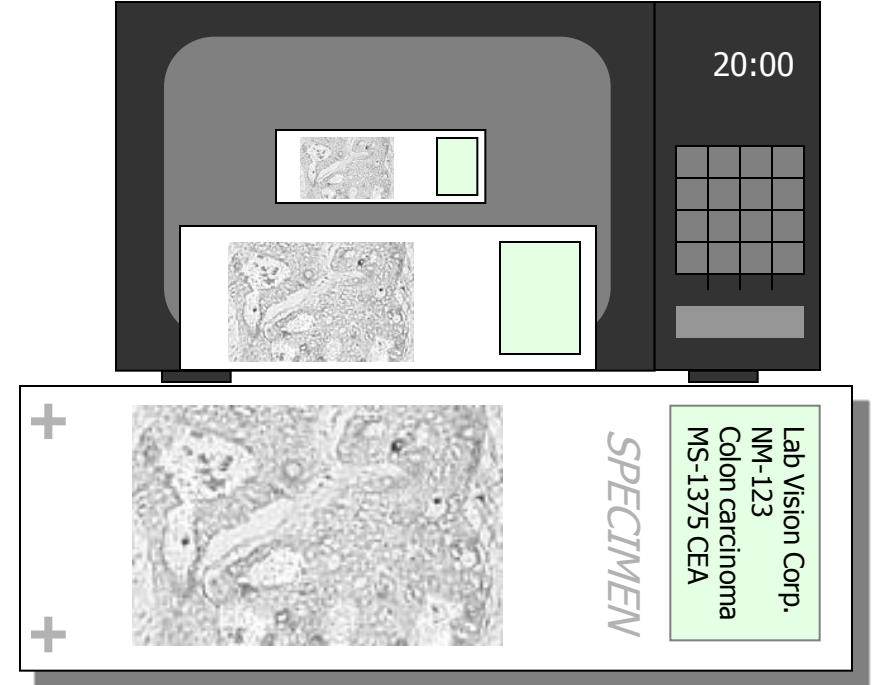
3% hydrogen peroxide solusyonu: 10 dk
endojen peroksidaz aktivite inhibisyonu

Örnek Protokol



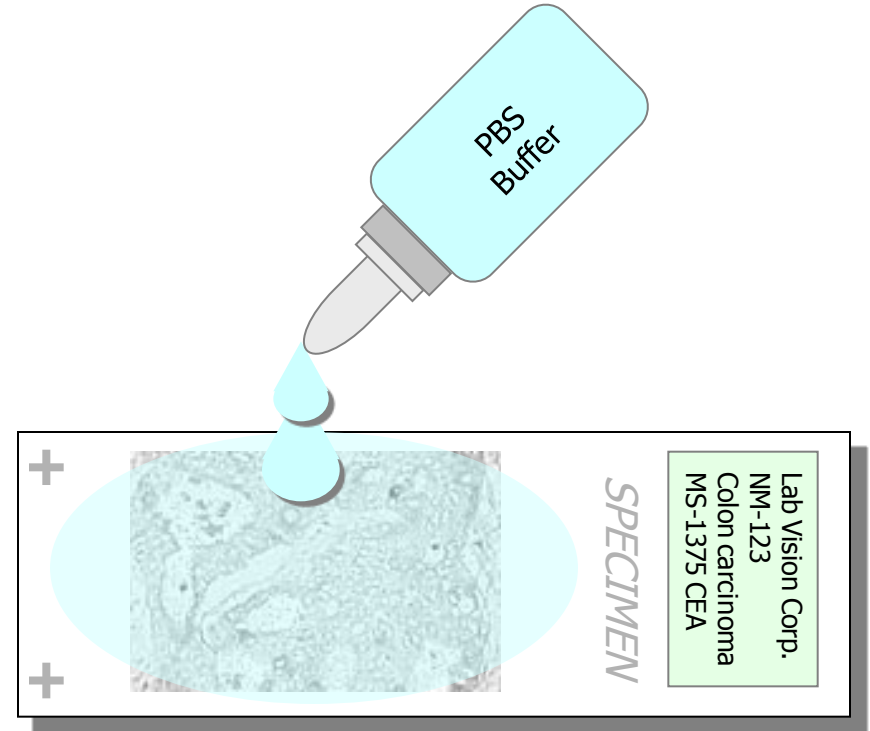
Distille su ile ve ardından PBS ile yıkama

Örnek Protokol



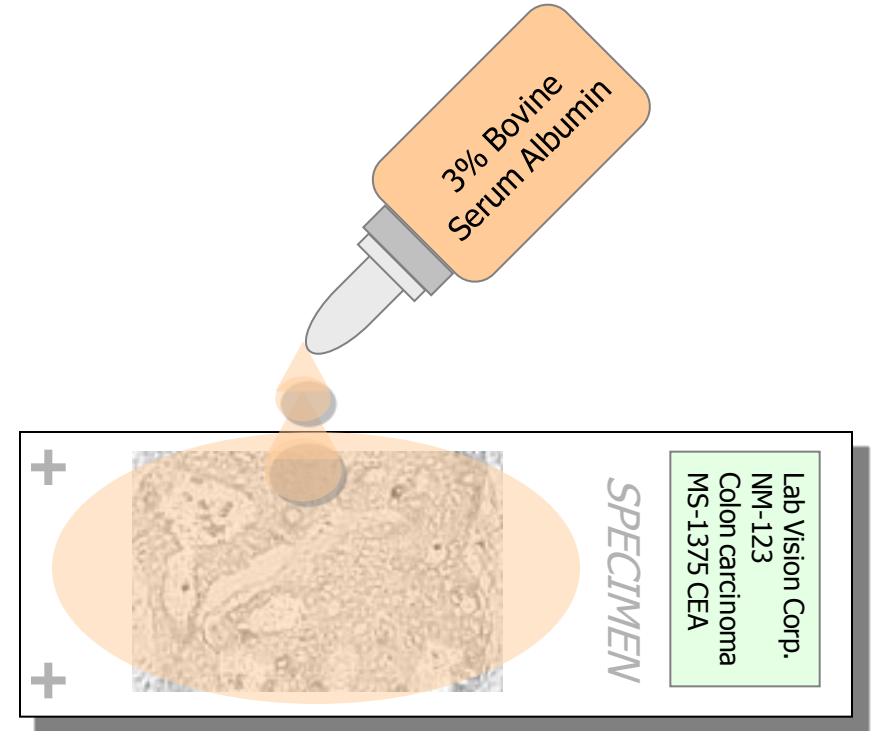
Microdalga: 20 dk
Sitrata Buffer pH 6.0.

Örnek Protokol



PBS ile yıkama.

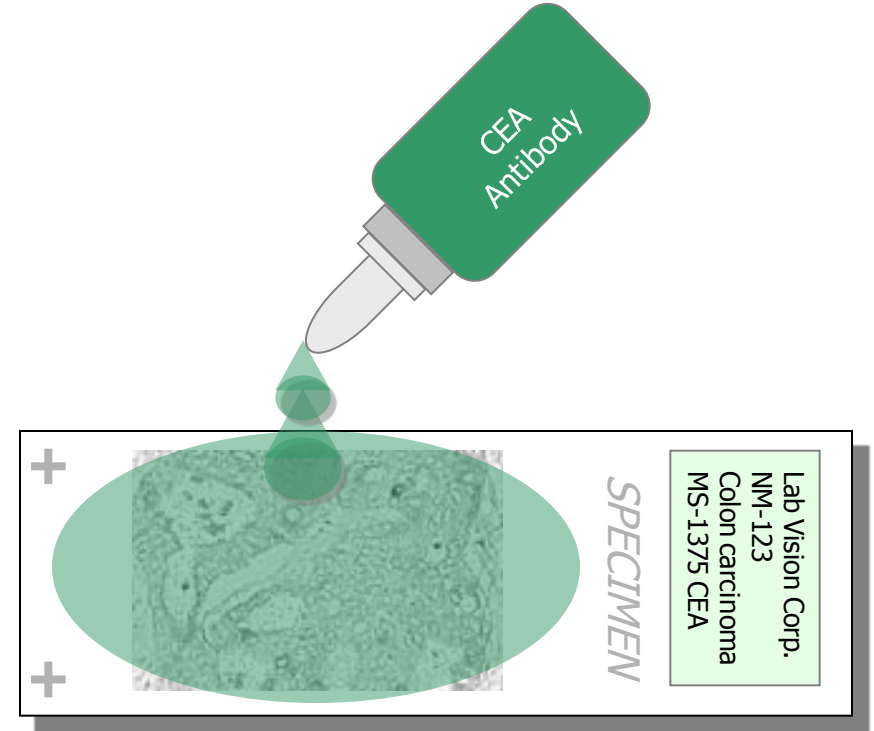
Örnek Protokol



% 3 bovine serum albumin (BSA):
Blok nonspesifik boyanma.

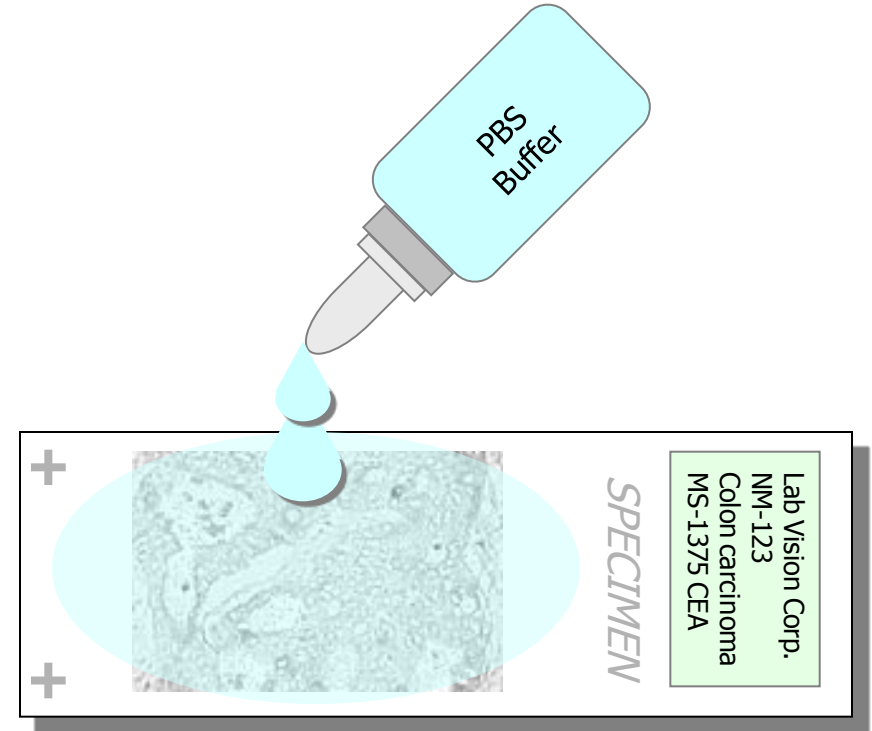
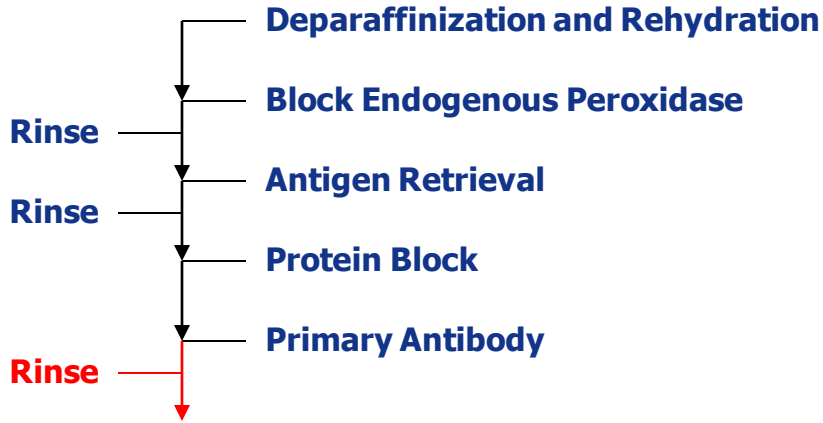
Örnek Protokol

- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Protein Block
- Primary Antibody**



Birincil Antikor (CEA) 30-120 dk RT
+4⁰ C tüm gece

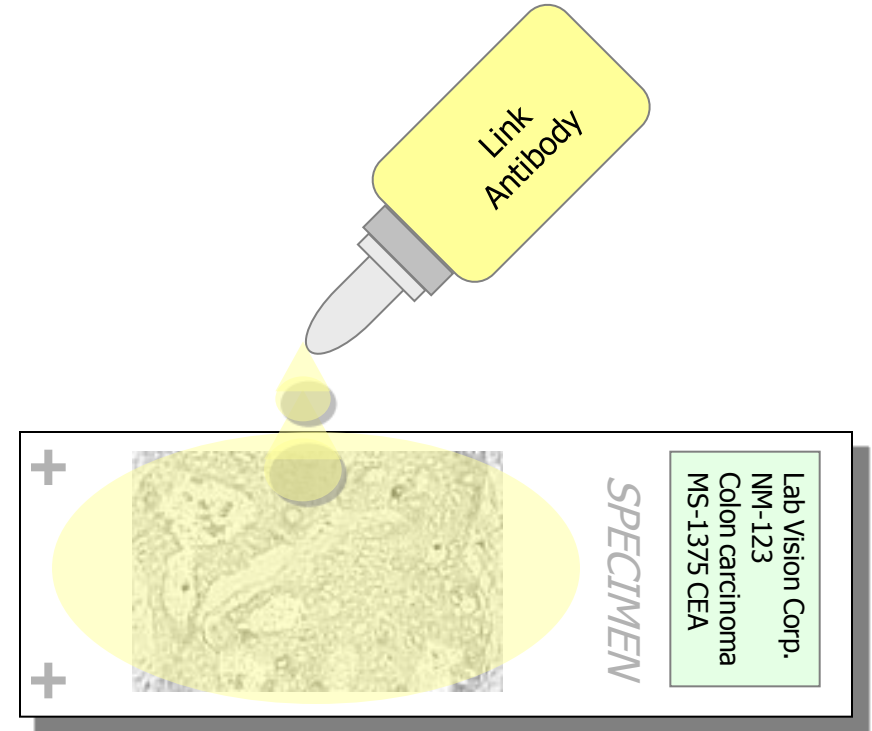
Örnek Protokol



PBS ile 3x5 yıkama

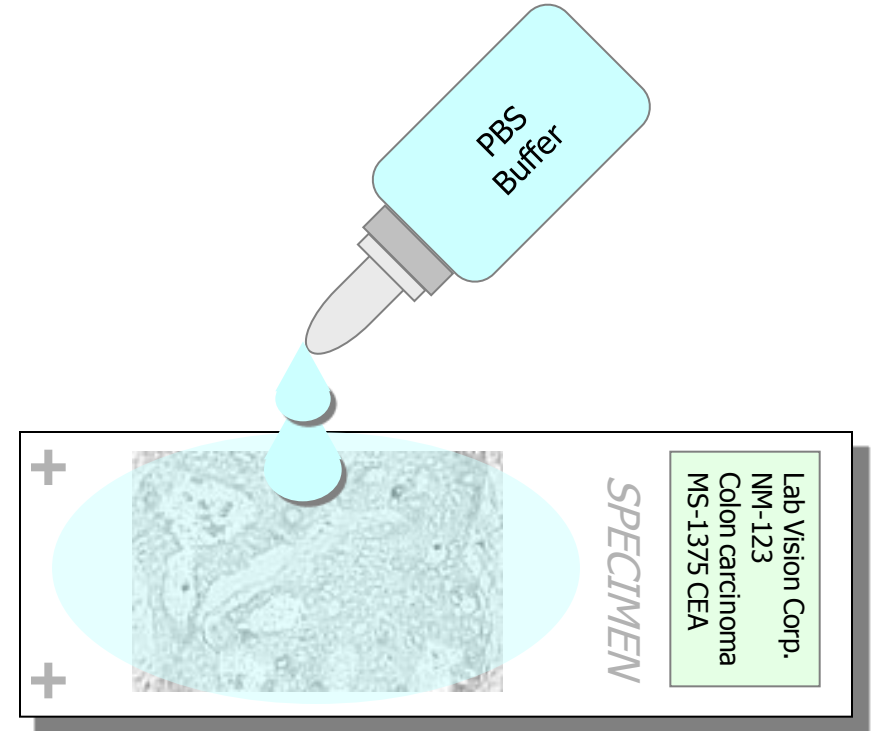
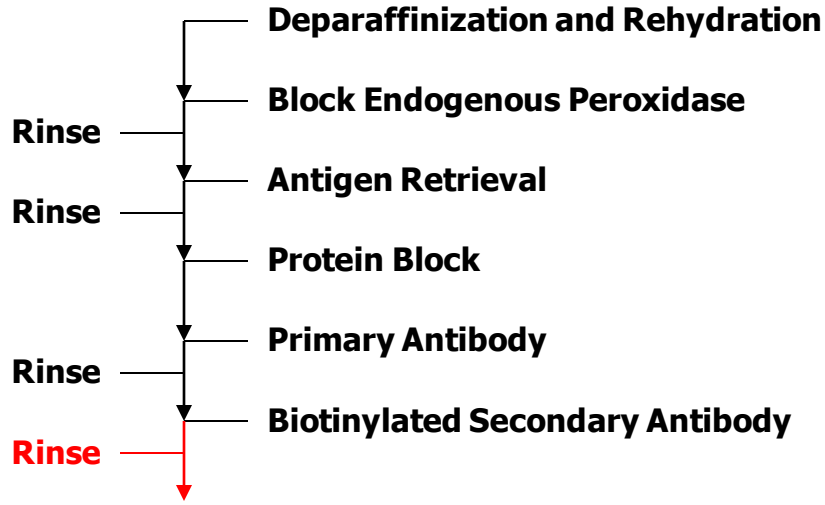
Örnek Protokol

- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Rinse
- Protein Block
- Rinse
- Primary Antibody
- Rinse
- Biotinylated Secondary Antibody**



Biotinlenmiş ikincil antikor: 10-30 dk RT

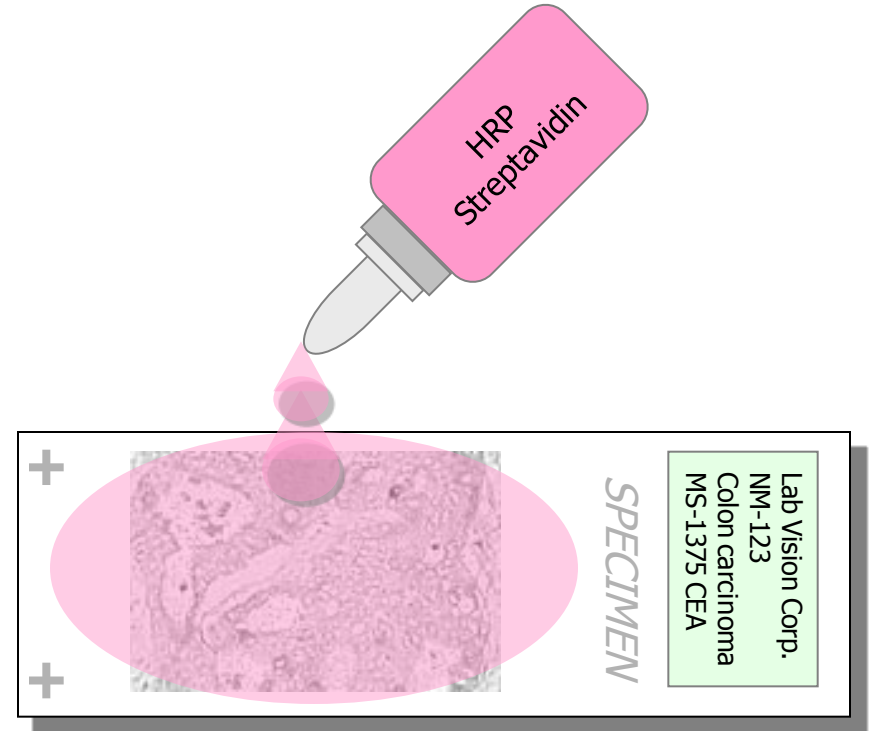
Örnek Protokol



PBS ile 3X5 yıkama

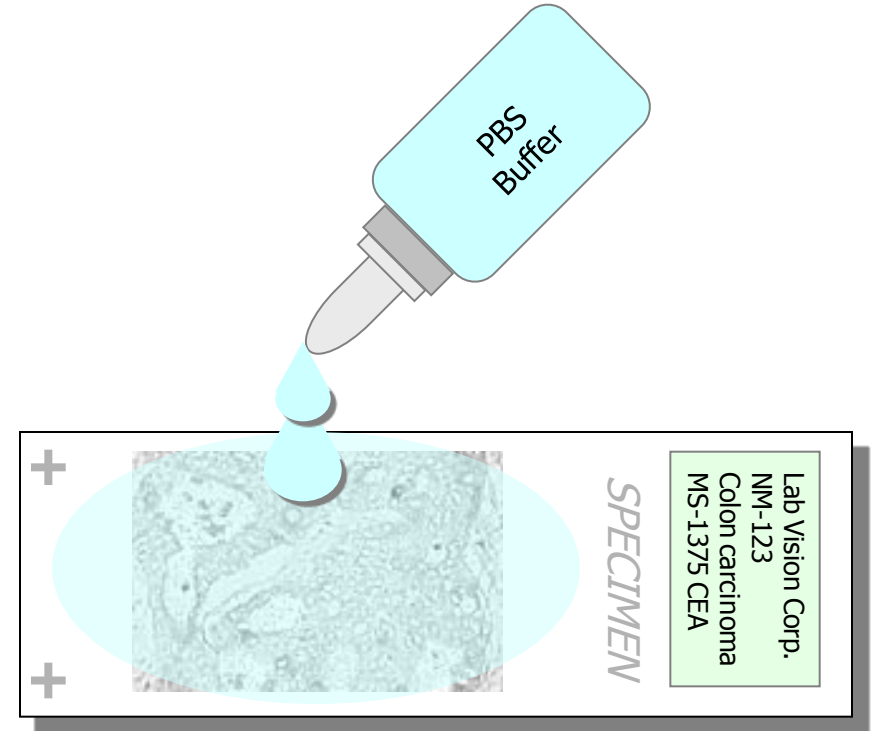
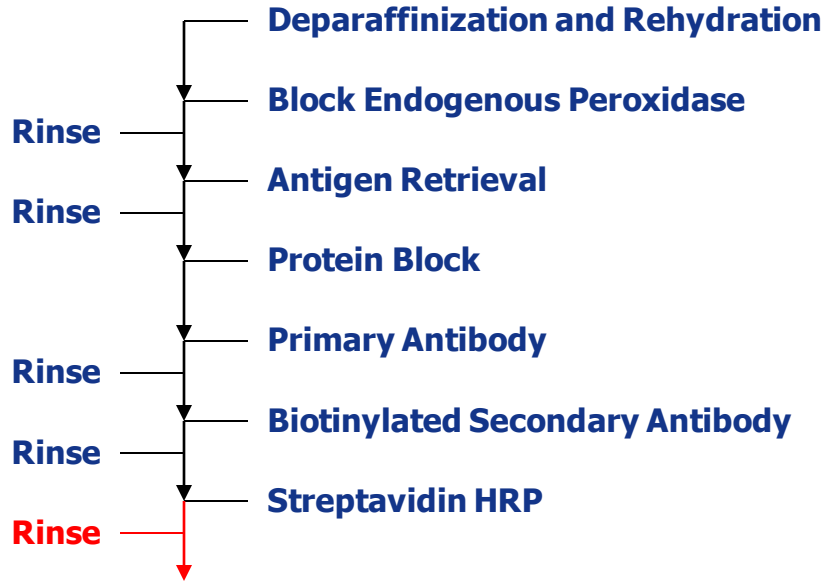
Örnek Protokol

- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Rinse
- Protein Block
- Rinse
- Primary Antibody
- Rinse
- Biotinylated Secondary Antibody
- Rinse
- Streptavidin HRP**



HRP konjuge streptavidininkübasyonu:10-30 dk RT

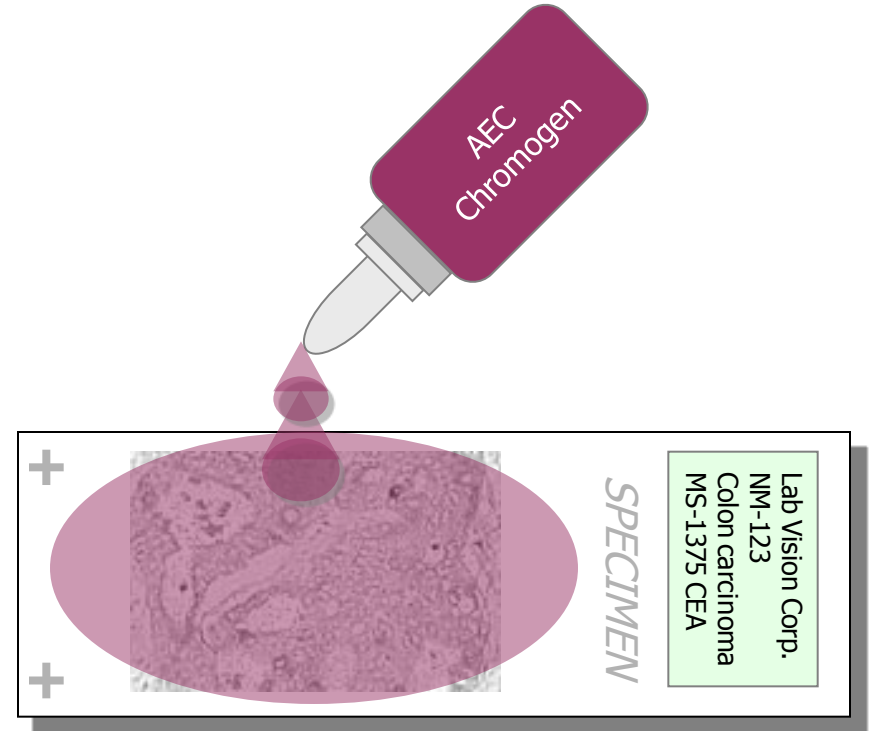
Örnek Protokol



PBS ile 3X5 yıkama

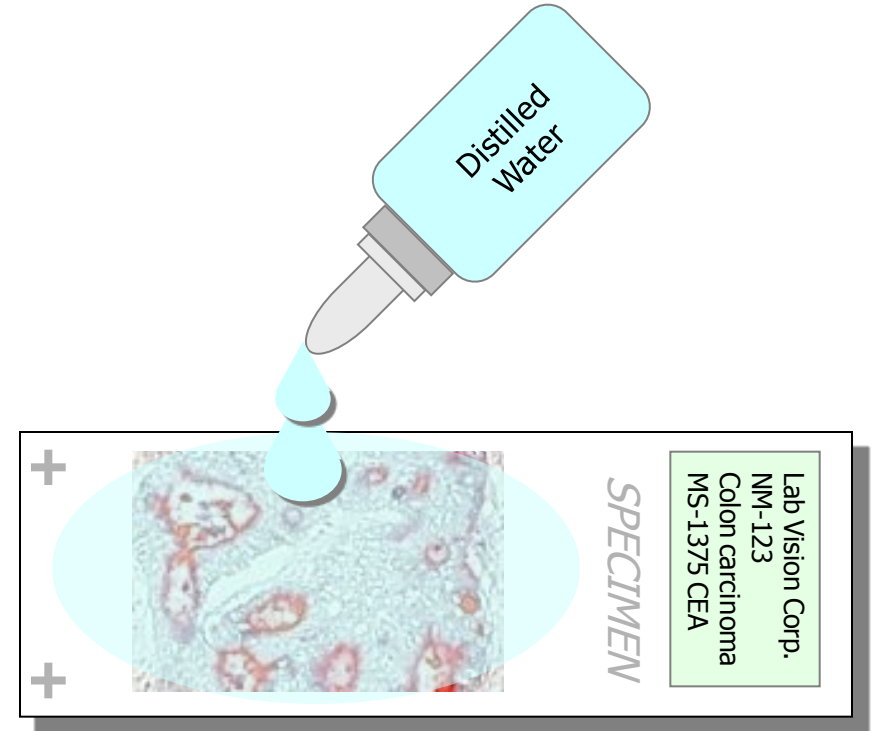
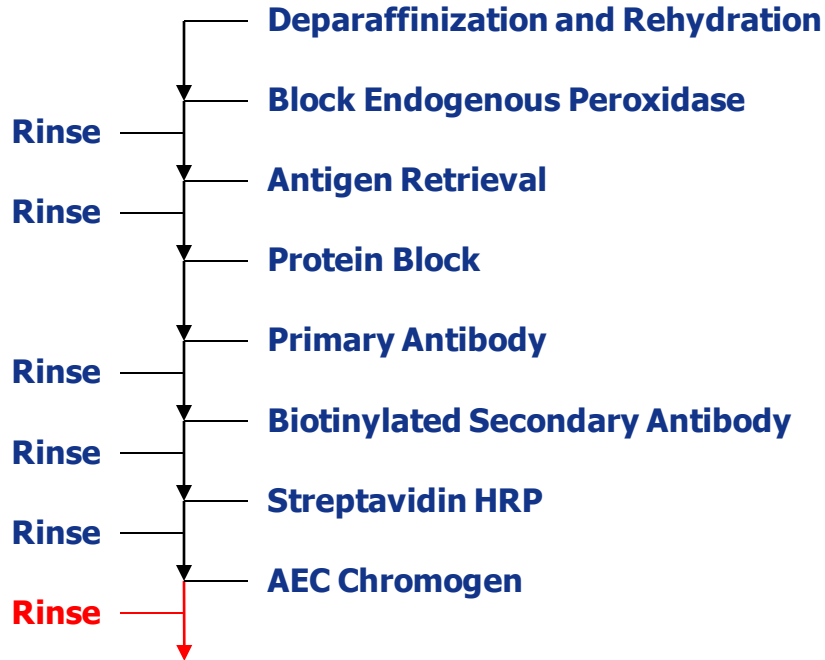
Örnek Protokol

- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Rinse
- Protein Block
- Rinse
- Primary Antibody
- Rinse
- Biotinylated Secondary Antibody
- Rinse
- Streptavidin HRP
- Rinse
- AEC Chromogen**



AEC kromojen uygulanması: 5-10 dk RT

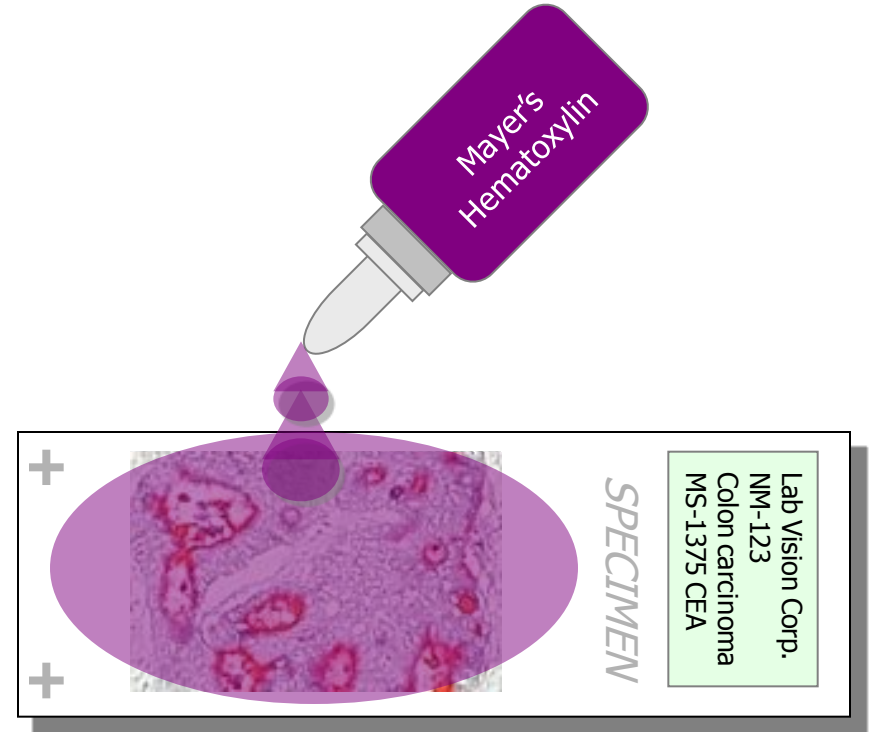
Örnek Protokol



PBS ile 3x5 yıkama ve ardından distile su ile yıkama.

Örnek Protokol

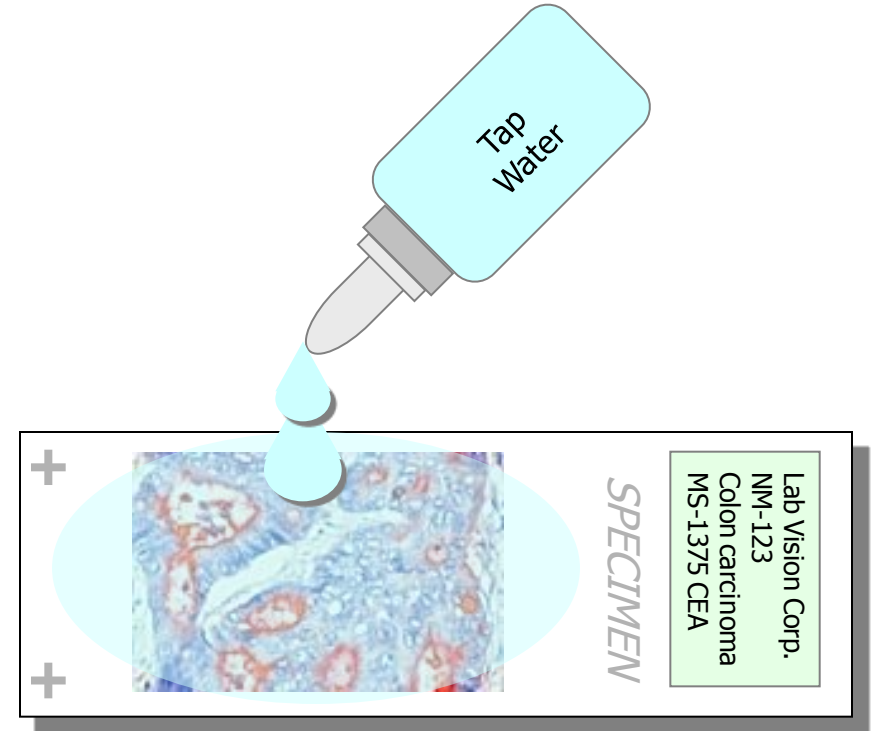
- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Rinse
- Protein Block
- Rinse
- Primary Antibody
- Rinse
- Biotinylated Secondary Antibody
- Rinse
- Streptavidin HRP
- Rinse
- AEC Chromogen
- Rinse
- Hematoxylin Counterstain**



Mayer's Hematoksilen ile 1 dk artalan boyaması

Örnek Protokol

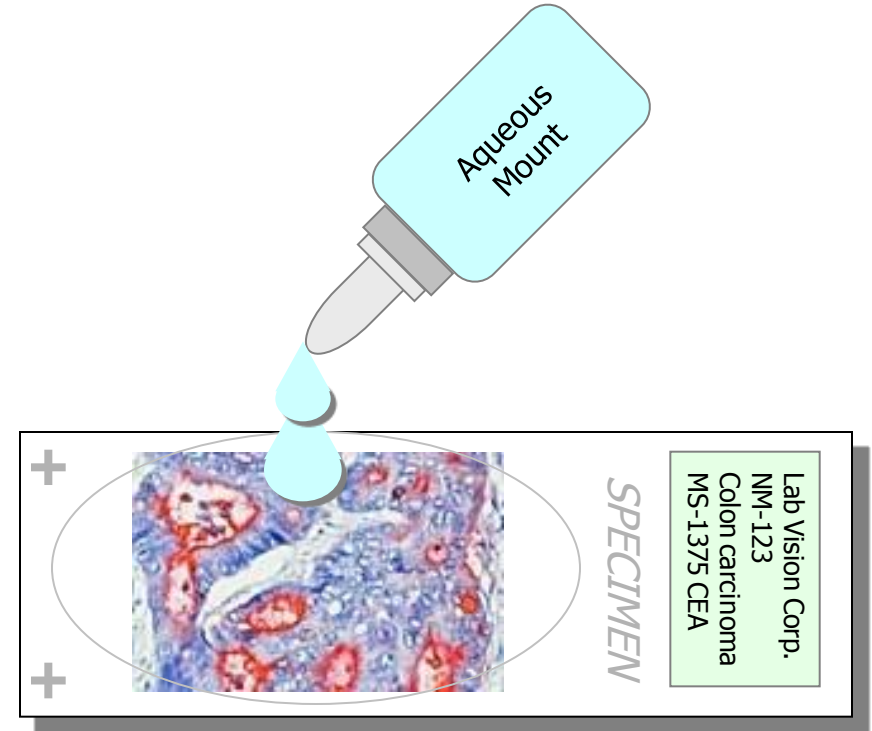
- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Rinse
- Protein Block
- Rinse
- Primary Antibody
- Rinse
- Biotinylated Secondary Antibody
- Rinse
- Streptavidin HRP
- Rinse
- AEC Chromogen
- Rinse
- Hematoxylin Counterstain
- Rinse



Yıkama (distile su veya çeşme suyu)

Örnek Protokol

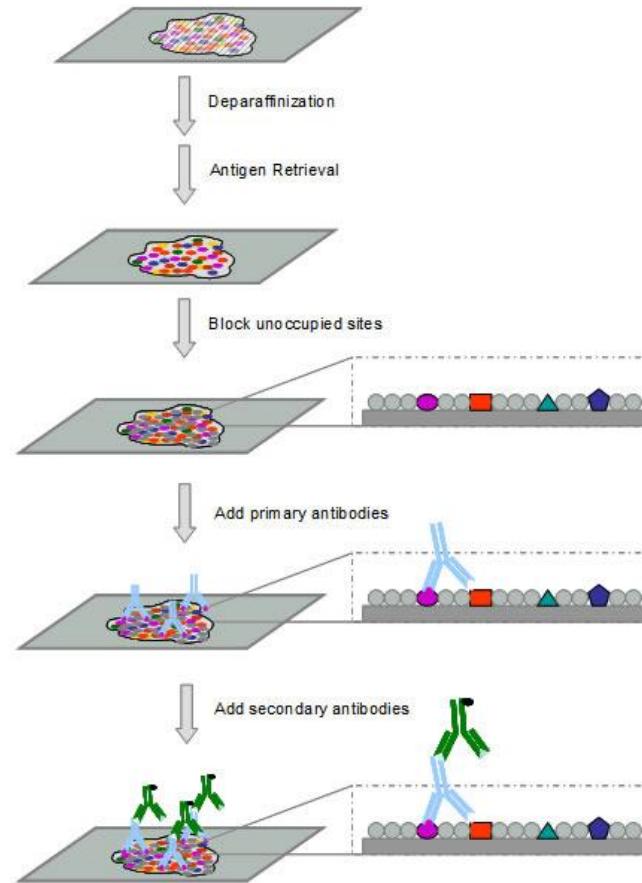
- Deparaffinization and Rehydration
- Rinse
- Block Endogenous Peroxidase
- Rinse
- Antigen Retrieval
- Rinse
- Protein Block
- Rinse
- Primary Antibody
- Rinse
- Biotinylated Secondary Antibody
- Rinse
- Streptavidin HRP
- Rinse
- AEC Chromogen
- Rinse
- Hematoxylin Counterstain
- Rinse
- Aqueous Mount**



Kapatma vasatı ile kapama.

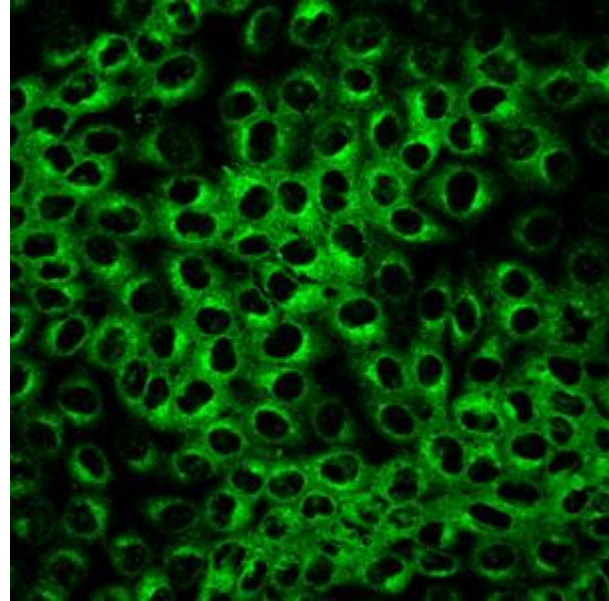
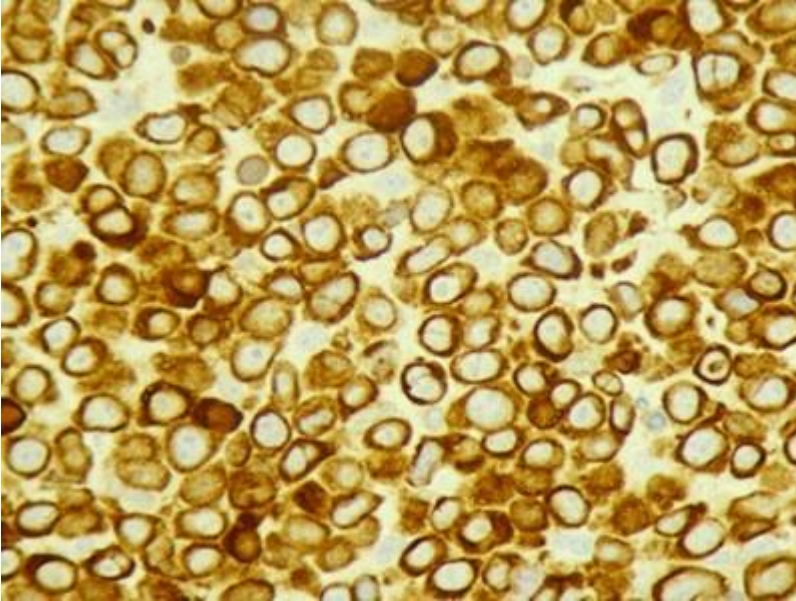
☐ Pozitif kontrol

☐ Negatif Kontrol

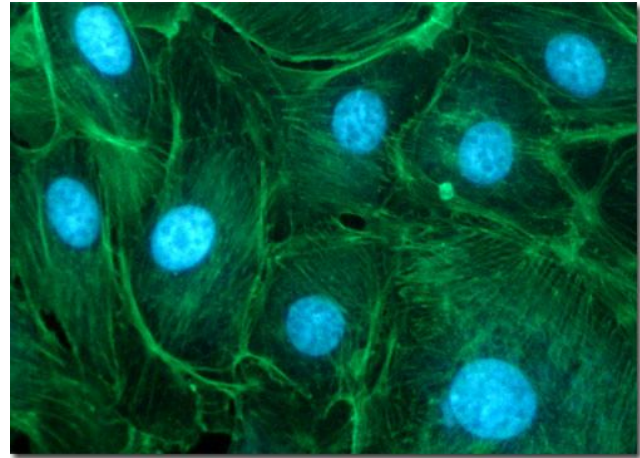
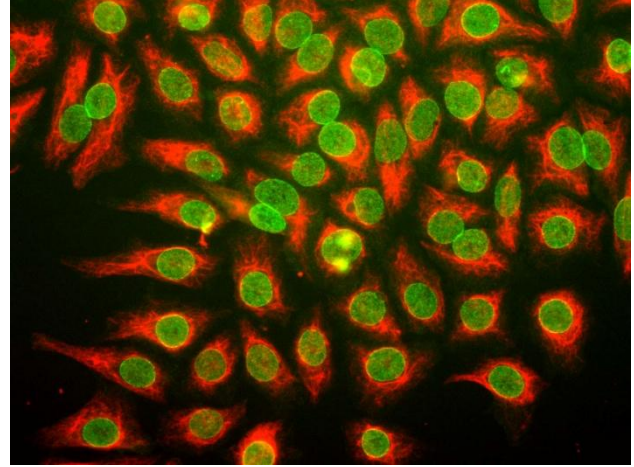
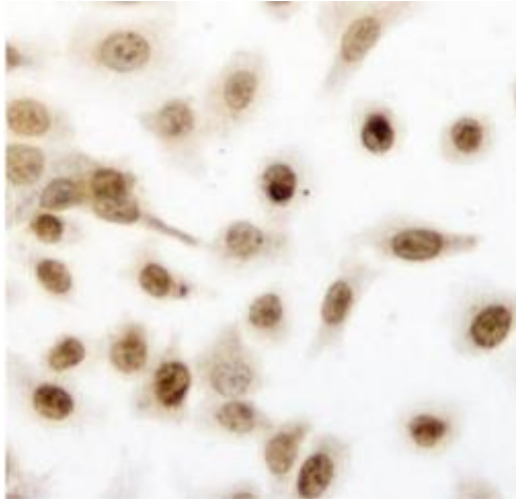
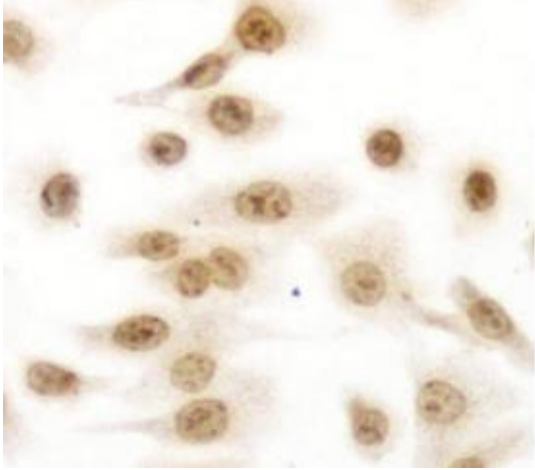


İmmunohistokimya Boyanma Profili

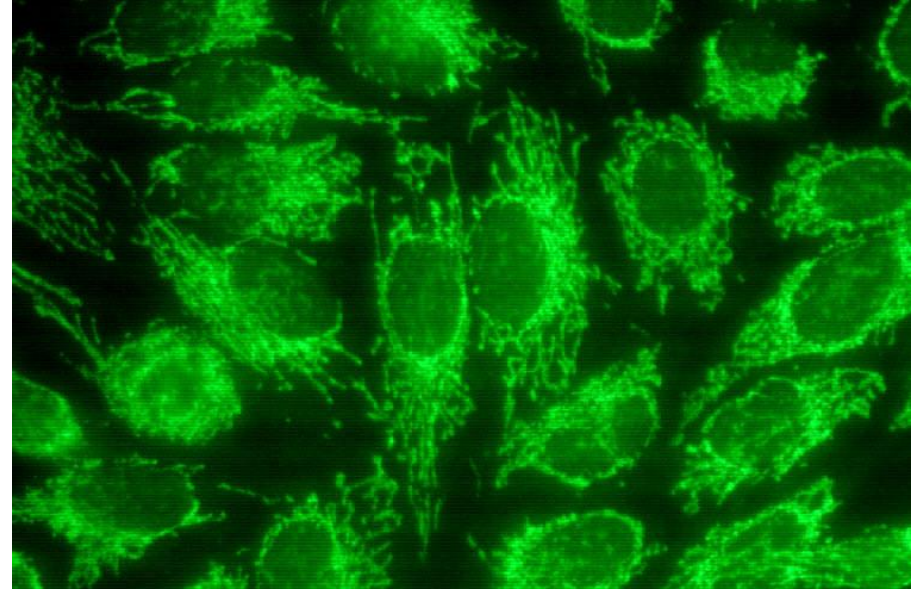
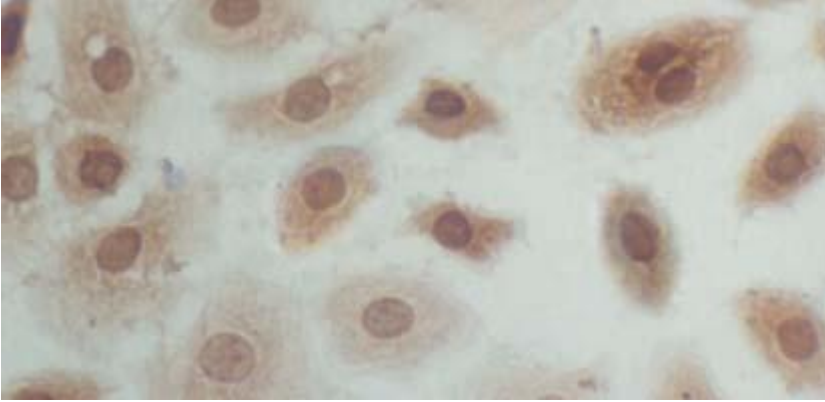
Hücre Membrani



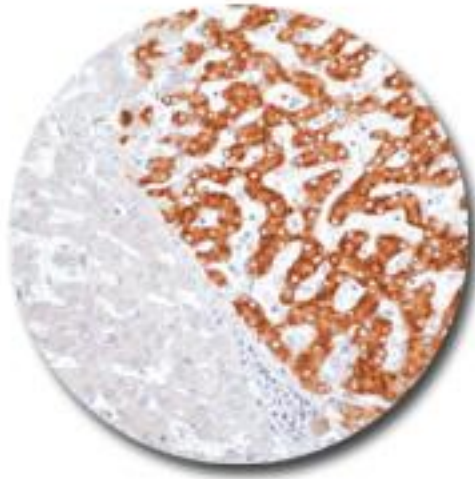
Çekirdek



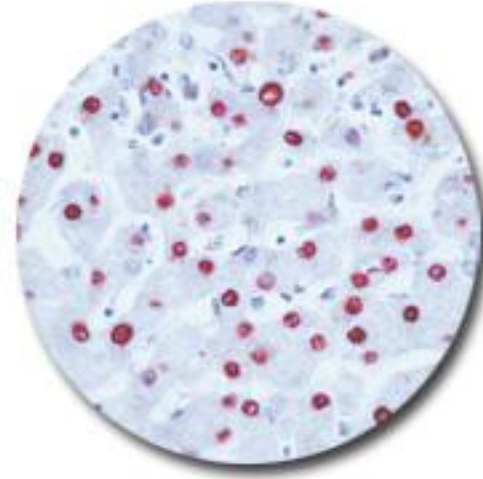
Sitoplazmik



Enfeksiyöz Ajanlar

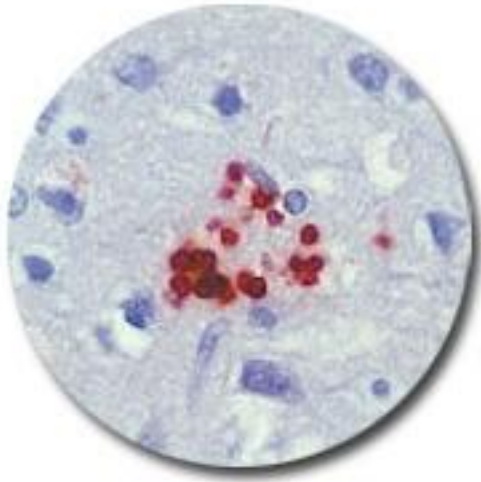


Hepatitis B Surface Antigen
(HBsAg)
Infected Liver
DAB Kromojen

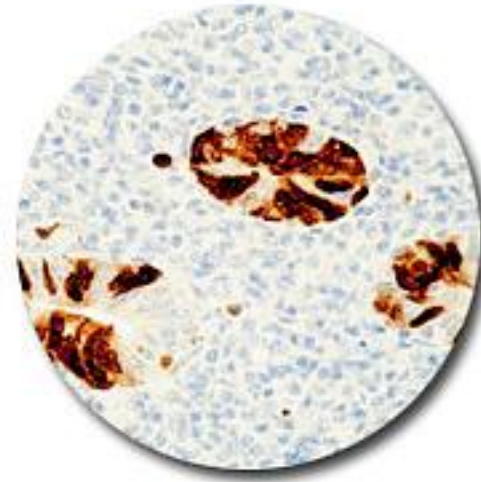


Hepatitis B Core Antigen
(HBcAg)
Infected Liver
AEC Kromojen

Enfeksiyöz Ajanlar



Toxoplasma gondii
Infected Brain
AEC Kromojen



Adenovirus
Infected Appendix
DAB Kromojen

Protokol

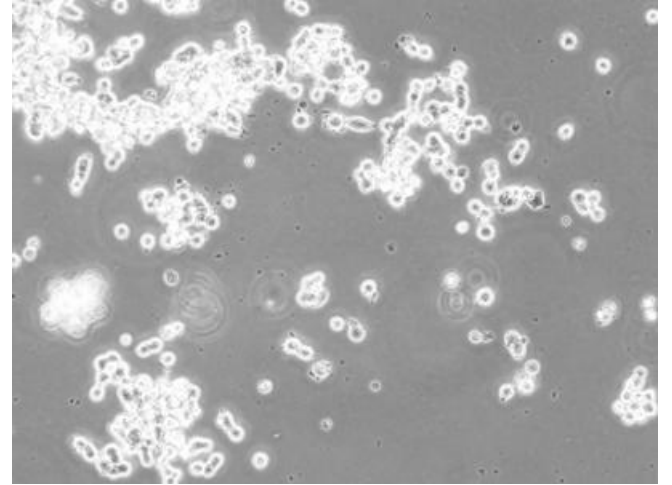
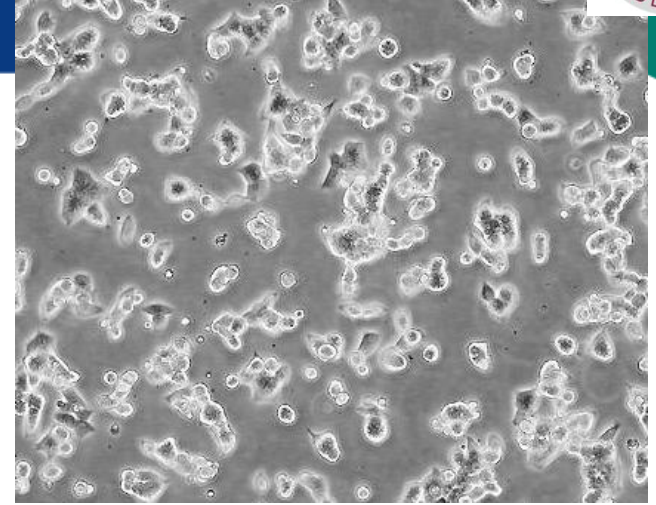
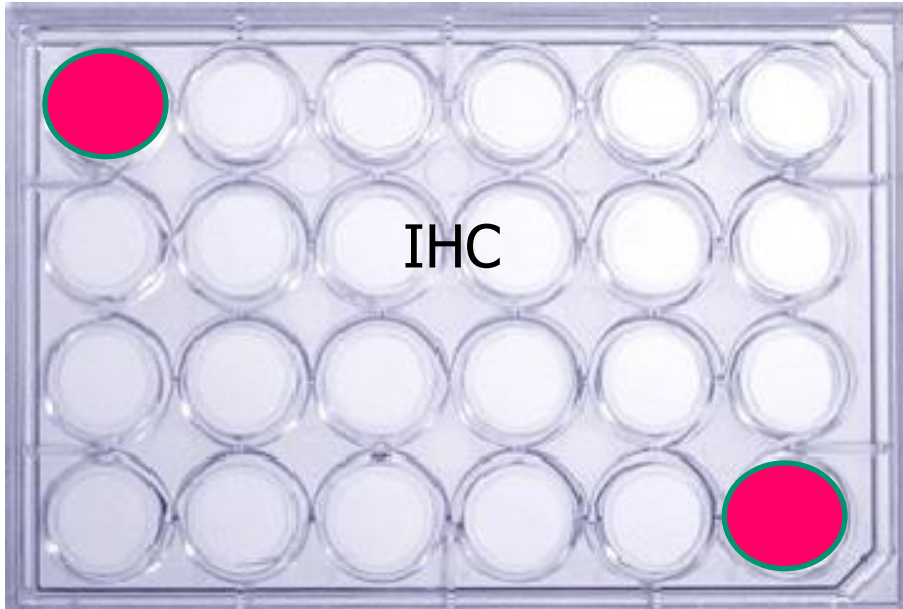
Hücre Kültürü



İşlem	Madde	Süre
Yıkama	PBS	5 dakika
Fiksasyon	%4 Paraformaldehit	30 dk
Yıkama	PBS	5 dakika
	%3' lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Permeabilizasyon	%0.1 Triton-X 100	15 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Primer Antikor	1 gece, 4°C de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	İkincil antikor	30 dakika
	Avidin-biotin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	Kromojen (DAB, AEC, vb)	5 dk
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Kapatma mediumu	

ÖRNEĞİMİZ

□ COLO-320



ÖRNEK PROTOKOL-HÜCRE KÜLTÜRÜ



YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
DESAM
UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU
Temel Prensipler
3-4 Haziran 2016

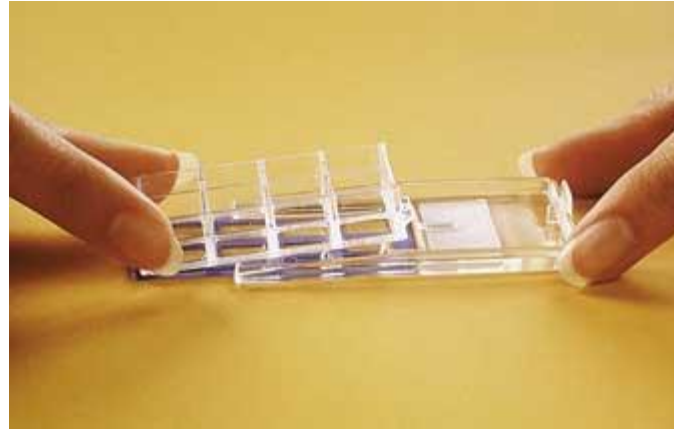
ÖRNEK PROTOKOL-HÜCRE KÜLTÜRÜ



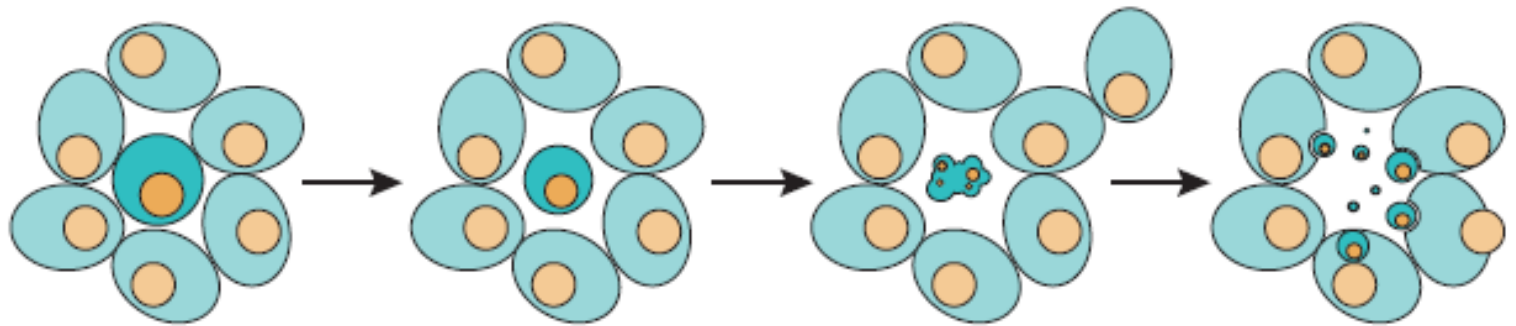
- ❑ Yuvarlak lamel çıkarılır
- ❑ Lam üzerine 1 damla kapatma medyumu konur
- ❑ Lamel hücre kapatma mediyumu üzerinde olacak şekilde kapatılır.
- ❑ İnceleme



Chamber Slides



APOPTOZ



- Change in refractive index

- Cell shrinkage
- Chromatin condensation

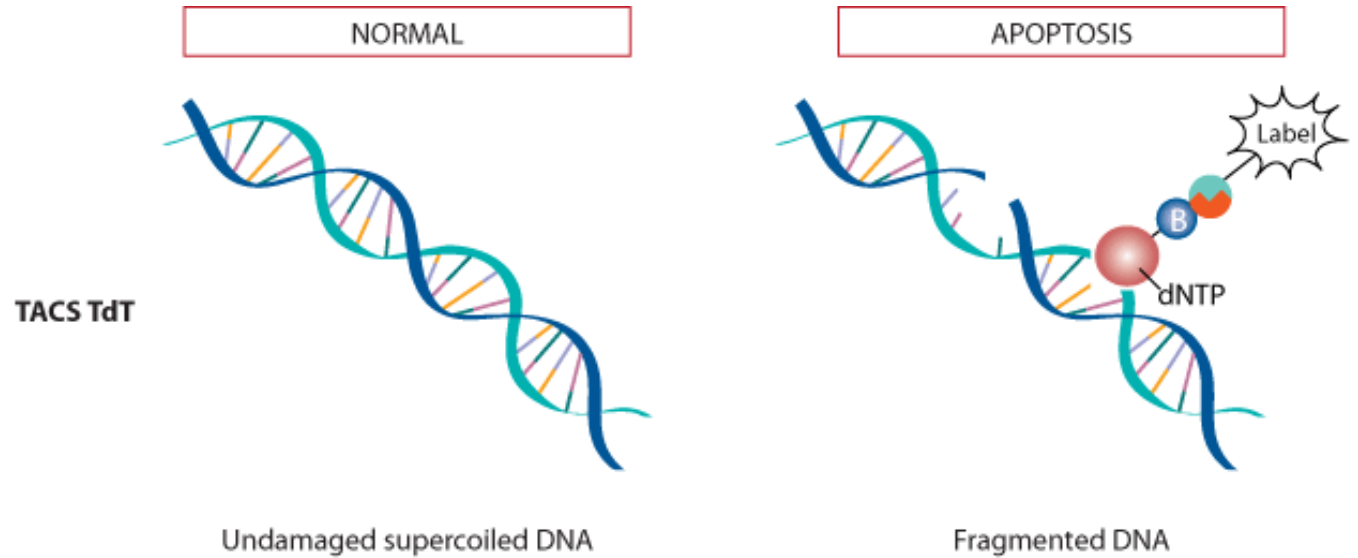
- Membrane blebbing
- Nuclear fragmentation

- Apoptotic body formation
- Phagocytosis by surrounding cells

TUNEL

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end labeling

- ❑ Parafin Kesitler
- ❑ Frozen Kesitler
- ❑ Hücre Kültürü Örnekleri
- ❑ Whole Mount

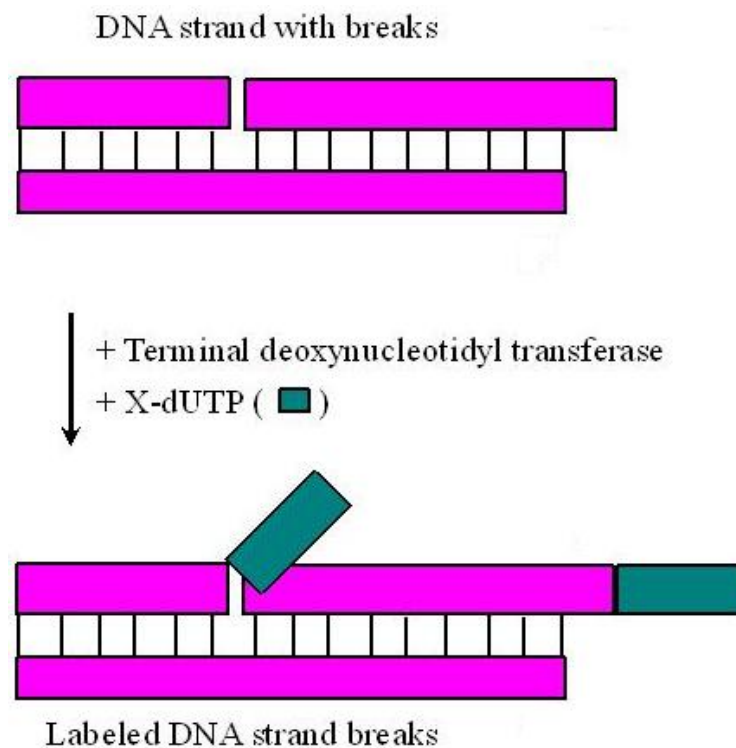


TUNEL

TUNEL

Terminal deoxynucleotidyl transferase **dUTP**
transferase-mediated **n**ick **e**nd-**l**abeling

- En yaygın kullanılan yöntem
- DNA kırıklarını tespit eder
- TdT enzimi ile tespit edilir
- dUTPs – belirteç



TUNEL

FİKSASYON

PERMEABİLİZASYON

**TdT ENZİM
UYGULAMASI**

İNCELEME

% 4 paraformaldehyde -30 Dk-1 saat Oda sıcaklığında
3 defa PBS ile yıkama

TUNEL



Fiksasyon

Permeabilizasyon

**TdT ENZİM
UYGULAMASI**

İnceleme

% 0.1 Triton X-100 ile 10 dk. buz üstünde
3 defa PBSt ile yıkama

TUNEL

Fixation

Permeabilizasyon

**TdT ENZİM
UYGULAMASI**

İnceleme

Tdt reaksiyon karışımı- 37°C 1 saat
3 defa yıkama

TUNEL

Fiksasyon

Permeabilizasyon

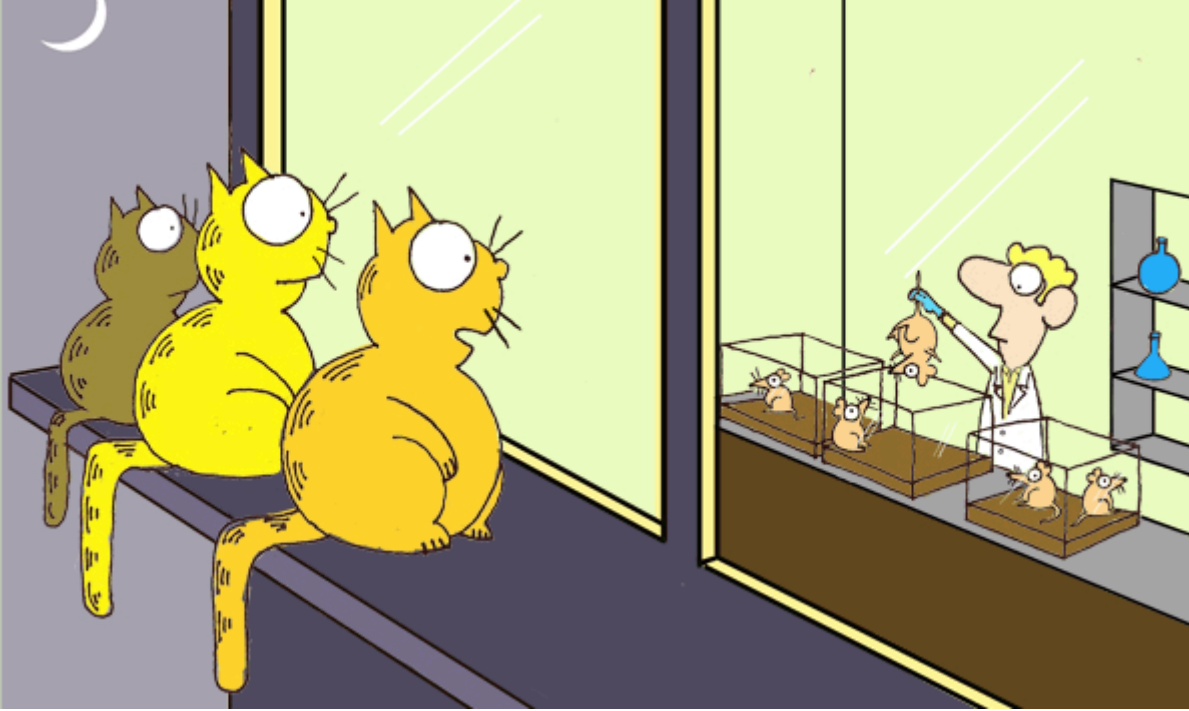
**TdT ENZİM
UYGULAMASI**

İnceleme

Işık Mikroskobu
Floresan Mikroskobu

İşlem	Madde	Süre
Yıkama	PBS	2x5 dk.
Permeabilizasyon	Triton-X 100	15 dk.
Yıkama	PBS	2x5 dk.
Primer Antikor	Tdt-enzim	1 saat (37 ⁰ C)
Yıkama	PBS	3x5 dk.
İnceleme		
Dönüştürme		30 dk.
Yıkama	PBS	3x5 dk.
Boyama	DAB	5 dk.
Yıkama	PBS	3x5 dk.
Kapatma	Kapatma mediumu	

TEŞEKKÜRLER



SORULARINIZ....

YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
DESAM
UYGULAMALI HÜCRE KÜLTÜRÜ KURSU
Temel Prensipler
3-4 Haziran 2016