مقاله تحقیقی

تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای خونساز

مسعود سلیمانی .Ph.D*، امیر آتشی .M.Sc*، حسین بهاروند .Ph.D*، محمد معصومی .M.Sc*

*گروه پژوهشی سلولهای بنیادی پژوهشکده رویان

تاریخ وصول: اسفند ماه ۸۳، تاریخ پذیرش: اردیبهشت ماه ۸۴

چکیده

هدف: تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش (Royan B1) به سلولهای خونساز

مواد و روشها: اجسام شبه جنینی تشکیل شده از سلولهای بنیادی جنینی در محیط سوسپانسیون القاکننده خونسازی که شامل سایتوکاینهای SCF،IL3،GM-CSF،TPO،FLt3،EPO بود، کشت داده شدند. وجود یا فقدان سلولهای تمایز یافته خونی با استفاده از تستهای RT-PCR، سنجش کلونی و رنگ‌آمیزی بنزیدین مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: وجود mRNA دو زنجیره هموگلوبین جنینی موشی در سلولهای تمایز یافته در کشت، بیانگر تمایز سلولهای بنیادی Royan B1 به سلولهای خونساز بود و مشخص نمود که سلولهای پیشساز خونساز نیز در سلولهای متمایز شده وجود دارد و این سلولها می‌توانند در محیط نیمه جامد، کلونیهای خونساز را به وجود آورند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که کشت اجسام شبه جنینی تشکیل شده از سلولهای بنیادی جنینی در محیط سوسپانسیون القاکننده خونسازی یک روش موثر در تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای خونساز است.

کلید واژه‌ها: سلولهای بنیادی جنینی موش، سلولهای خونساز، تمایز

مقدمه

سلولهای بنیادی جنینی[1]، سلولهای پرتوان مشتق از توده سلولی داخلی بلاستوسیست هستند [۱ و ۲]. این سلولها قادر به باقی ماندن در حالت نامتمایز و بدون از دست دادن پرتوانی در محیط کشت هستند. همچنین قابلیت تمایز این سلولها به سلولهای مشتق شده از هر سه لایه زاینده جنینی، ثابت شده است [۳ و ۴].

سلولهای بنیادی جنینی موش یک ابزار مناسب برای بررسی روند خونسازی در مراحل مختلف از جمله پیش از تولد هستند. با استفاده از این سلولها و القای خونسازی در آنها می‌توان به الگوی کاملی از Switching هموگلوبین در مراحل رویانی، جنینی و بلوغ پستانداران پی برد.

سیستم خونسازی موش در اوایل مرحله رویانی در کیسه زرده که مشتق از مزودرم است، شروع به خونسازی اولیه می‌کند [۵ و ۶]. نخستین شواهد خونسازی به‌صورت جزایر خونساز و در قالب تشکیل سلولهای اریتروئیدی اولیه بروز می‌یابد [۵، ۶ و ۷]. با گذر از این مقطع خونسازی در کبد، عمده خونسازی در طول دوران جنینی محسوب می‌شود. [۶].

یکی از مرسوم‌ترین روشها در بررسی خونسازی اولیه، استفاده از سیستمهای کشت بر مبنای استفاده از سلولهای بنیادی جنینی است. نشان داده شده است که این سلولها در تمایز به سلولهای خونساز، از *in vivo* تقلید می‌کنند [۸ و ۹]. در مطالعه تمایز سلولهای بنیادی جنینی معمولیترین روش، تشکیل جسم شبه‌جنینی (EB)[2] است. به همین ترتیب در مطالعه خونسازی محققان برای تمایز سلولهای خونساز از سلولهای بنیادی جنینی موش در *in vitro* از دو روش استفاده کرده‌اند:

اولین روش، تشکیل EB از سلولهای بنیادی جنینی در محیط کشت نیمه جامد [۱۰ و ۱۱] است. در دومین روش از

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه پژوهشی سلولهای بنیادی، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ Email:Soleim_m@modares.ac.ir

1.Embryonic stem cells 2. Embryoid body

هم‌کشتی با رده‌های سلولی استرومائی مانند OP9 [۸ و ۱۲] یا کشت در پلیتهای پوشیده شده از کلاژن [۱۳] استفاده شده است.

در مطالعه‌ای که اخیراً انجام گرفته است [۱۴] نشان داده شده است که دو روش فوق در مقایسه با هم از لحاظ توانایی القای خونسازی برابر نیستند و روش تشکیل EB روشی کارآمدتر در تولید سلولهای خونساز از سلولهای بنیادی جنینی است. این مطالعه به تمایز مستقیم سلولهای بنیادی جنینی موش (Royan B1) به سلولهای خونساز در محیط کشت مایع و بدون استفاده از سلولهای تغذیه‌کننده و تنها با استفاده از فاکتورهای رشد موثر در خونسازی می‌پردازد.

مواد و روشها

کشت سلولهای بنیادی جنینی موش (Royan B1)

سلولهای بنیادی جنین موش (Royan B1) از نژاد C57BL/6 روی لایه تغذیه‌کننده MEF[1] همراه با LIF کشت داده شدند [۱۵]. محیط کشت برای تکثیر سلولهای بنیادی جنینی عبارت بود از Knock out D-MEM (Gibco)، ۱۵ درصد FCS (Gibco)، ۲ میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانول (Sigma)، ۰/۱ میلی‌مولار ال-گلوتامین (Sigma)، ۰/۱ میلی‌مولار اسیدهای آمینه غیر ضروری (Gibco) و فاکتور ممانعت‌کننده لوکمیایی (LIF) (Chemicon) با غلظت ۱۰۰۰U/ml.

تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای خونساز

برای تشکیل اجسام شبه جنینی (EBs) مورد استفاده در این مطالعه از روش قطره‌گذاری[2] استفاده شد. در این روش تعداد ۸۰۰ سلول بنیادی جنینی موش در هر قطره به‌صورت آویزان در محیط کشت سلولهای بنیادی جنینی موش کشت شدند. این محیط شامل محیط کشت Knock out D-MEM (Gibco) با افزودنیهای زیر بود:

۱۵ FCS درصد (Gibco)، ۲ میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانول (Sigma)، ۰/۱ میلی‌مولار ال - گلوتامین (Sigma)، ۰/۱ میلی‌مولار اسیدهای آمینه غیر ضروری (Gibco) ۱۰۰U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰μg/ml استرپتومایسین (Gibco)، پس از ۲ روز انکوباسیون در ۳۷° سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد، اجسام شبه‌جنینی تشکیل شدند. در اجسام شبه‌جنینی ژنهای سه لایه زاینده جنینی یعنی اکتودرم، اندودرم، مزودرم بیان می‌شود. اجسام شبه‌جنینی از میان قطرات برداشته شد و در دیشهای باکتریال (Griner) با همان محیط کشت قبلی کشت شدند. پس از گذشت ۲ روز از کشت در دیش باکتریال، تعداد ۵۰ جسم شبه‌جنینی به دو خانه از پلیت ۶ خانه (TPP) منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده برای القای خونسازی در این مرحله شامل: محیط کشت (Iscovs Modified Dullbecco Medium) IMDM، ۱۵ درصد FBS، ۰/۱ میلی‌مولار ال - گلوتامین، ۲ میلی‌مولار بتا مرکاپتواتانول، ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین به همراه فاکتورهای رشد: (۲۰ ng/ml) SCF، (۱۰ ng/ml) TPO، (۲۰ ng/ml) GM-CSF، (۲۰ ng/ml)، (۲۰ ng/ml) FLt-3، (۲۰ ng/ml) IL-3، (۱ U/ml) EPO (کلیه فاکتورهای رشد فوق از شرکت R&D system خریداری شدند).

محیط کشت هر دو روز یکبار تعویض شد و در این مدت اجسام شبه‌جنینی به کف پلیت چسبیده و تغییرات مربوط به تکثیر و تمایز در آنها مشهود بود. در روز ۷ پس از کشت در محیط القاکننده، اجسام شبه‌جنینی تمایز یافته از کف پلیت با کمک پی‌پتاژ کننده شده و با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ درصد و ۰/۳۵ میلی‌مولار EDTA به‌صورت تک سلولی درآمده و برای انجام آزمونهای RT-PCR به منظور بررسی وجود سلولهای اریتروئیدی از طریق پیگیری بیان ژنهای (β-Like embryonic chain (β-H1) و α-Linke embryonic chain (zeta) و سنجش توانایی تشکیل کلونی برای ارزیابی عملکردی سلولهای تمایز یافته، آزمایش شد.

آزمون RT-PCR

در ابتدا با استفاده از محلول RNX-plus^{TM} (سیناژن)، کل موجودی RNA سلولی از بن‌یاخته‌های جنینی موشی رویان B1 و سلولهای تمایز یافته به سلولهای خونساز استخراج شد. قبل از انجام نسخه‌برداری معکوس، نمونه‌های RNA استخراج شده

1. Mouse embryonic fibroblast
2. Hanging drop

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژنهای مورد بررسی و دمای آنیلینگ و طول قطعه تکثیر شده

نام ژن	توالی پرایمرهای مورد استفاده	دمای annealing	طول قطعه تکثیر شده
Mouse alpha like chain	Forward:5′ CAC TGT CTG CTG GTC ACA ATG 3′ Reverse:5′ GAG GAG AGG GAT CAT AGC TG 3′	۶۲°C	۱۶۵bp
Mouse beta like chain	Forward:5′ GAC AAC CTC AAG GAG ACC TTT G 3′ Reverse: 5′ GCC ACT CCA ATC ACC AGC TTC 3′	۶۴°C	۱۸۰ Pb
Mose Beta Tubulin	Forward: 5′ GGA ACA TAG CCG TAA ACT GC 3′ Reverse: 5′ TCA CTG TGC CTG AAC TTA CC 3′	۶۰°C	۳۱۷ pb
Mouse Oct-4	Forward: 5′ GGC GTT CTC TTT GGA AAG GTG TTC 3′ Reverse: 5′ CAT ACT CGA ACC ACA TCC TTC TCT A 3′	۶۵°C	۳۱۷ pb

تحت تیمار با DNase I (Roche) قرار گرفتند تا آلودگیهای احتمالی مربوط به DNA ژنومیک از نمونه‌های RNA حذف شود. سپس غلظت RNA استخراج شده با روش اسپکتروفوتومتری تعیین شد.

۲ میکروگرم از RNA استخراج شده برداشته و با استفاده از پرایمر Random Hexamer و کیت (Fermentas) Revert Aid ^{TM}H Minus Firsr Strand cDNA Synthesis Kit نسخه‌برداری معکوس انجام شد. سپس روی cDNA تولید شده PCR صورت گرفت. برای این منظور مواد زیر در یک لوله PCR با یکدیگر مخلوط شدند؛ ۲/۵ μl cDNA،1X PCR، ۰/۵μM of each primer pair، ۲۰۰ μM dNTPs، (AMS)، Taq DNA polymerase(Fermentas) ۱unit/۲۵μl reaction.

شرایط PCR برای ۳۵ سیکل به‌صورت:

۱) واسرگشتی اولیه: ۵ دقیقه (۹۳° سانتی‌گراد)

۲) واسرشتگی هر سیکل: ۴۵ ثانیه (۹۳° سانتی‌گراد)

۳) annealing Temp، با توجه به جدول ۱ و ۴۵ ثانیه

۴) Extension هر سیکل ۴۵ ثانیه، (۷۲° سانتی‌گراد)

۵) Extension انتهایی ۱۰ دقیقه (۷۲° سانتی‌گراد)

محصولات PCR روی آگارز ۱/۵ درصد جدا شدند و با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده شدند.

پرایمرهای مربوط به ژنهای مورد بررسی و توالی آنها، دمای آنیلینگ و طول قطعه تکثیر شده در جدول ۱ آمده است.

آزمون سنجش کلونی

سنجش کلونی به منظور بررسی توانایی تشکیل کلونیهای خونساز در *In vitro* صورت گرفت. محیط کشت سنجش کلونی به‌صورت مخلوطی از ۳۰ درصد FBS، ۴۰ درصد محیط IMDM (Gibco) و ۳۰ در صد متیل سلولز ۰/۹ درصد (R&D sysem) و ۵۰ هزار سلول در هر میلی‌لیتر به همراه فاکتورهای رشد IL-3 به مقدار ۲۰ ng/m1، فاکتور سلول بنیادی (SCF) به مقدار ۲۵ ng/m1، ۳ U/m1 EPO و GM-CSF به مقدار ۲۰ng/m1 تهیه شد. سلولهای تمایز یافته با استفاده از تریپسین ۰/۰۵ درصد و ۰/۳۵ میلی‌مولار EDTA (Gibco)، به‌صورت تک‌سلولی درآمده و در محیط کشت به همراه فاکتورهای رشد و FBS به متیل سلولز اضافه شده و در پلیت چهار خانه کشت شدند. این محیط نیمه جامد برای چهارده روز از لحاظ وجود کلونی بررسی شد. و در پایان چهارده روز تعداد کلونیها شمارش شدند.

رنگ‌آمیزی بنزیدین

رنگ‌آمیزی بنزیدین به منظور بررسی وجود سلولهای اریتروئیدی و وجود هموگلوبین انجام گرفت. بنزیدین در صورت وجود هموگلوبین به آن متصل شده و رنگ قهوه‌ای تیره به کلونی اریتروئیدی می‌دهد. بعد از گذشت ۱۴ روز محیط کشت از لحاظ وجود کلونیهای بنزیدین مثبت بررسی و کل کلونیها شمارش شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به آزمون RT-PCR

ژنهای مورد بررسی در اینجا مربوط به زنجیره‌های هموگلوبین رویانی موش بوده‌اند و نشان داده شد که طی ۷ روز اول کشت در محیط سوسپانسیون زنجیره‌های فوق بیان شده‌اند و این نشان‌دهنده وجود خونسازی رویانی در کلونهای خونسازی مورد بررسی است. میزان بیان ژن Oct-4 که از جمله ژنهای شاخص بیان شونده در سلولهای بنیادی جنینی است، در سلولهای Royan B1 بیان داشته‌اند و این در حالی است که میزان بیان این ژن در سلولهای تمایز یافته به صفر می‌رسد. مشاهده نشدن باند در RT منفی و بیان بتا-توبولین در هر دو سلول، یعنی سلول بنیادی جنینی و سلولهای تمایز یافته به عنوان ژنی که باید در هر دو بروز داشته باشد، نشانگر صحت کارکرد RT-PCR است.

شکل ۱ نمایانگر حرکت محصولات PCR در ژل الکتروفورز است.

نتایج مربوط به آزمون سنجش کلونی

با توجه به این نکته که فعالیت عملکردی سلولهای خونساز با توانایی آنها در تشکیل کلونی همراه است، این آزمون انجام گرفت. برای بررسی تعداد کلونیهای شمارش شده از میانگین نتایج حاصل از ۴ بار تکرار سنجش استفاده شد (جدول ۲).

تکرار آزمایش	تعداد کلونیهای شمارش
۱	۸۲
۲	۳۳
۳	۵۹
۴	۴۹
جمع کل	۲۲۳
SD±میانگین	۵۶±۲۰/۵

شکل ۲. تصویر تشکیل کلونی را در روز دهم در محیط کشت نیمه‌جامد متیل سلولز نشان می‌دهد.

نتایج مربوط به تایید کلونیها

در تایید جواب RT-PCR مبنی بر وجود سلولهای اریتروئیدی فعال از لحاظ تولید زنجیره‌های هموگلوبین، آزمون بنزیدین با رنگ کردن کلونیهای اریتروئیدی به رنگ قهوه‌ای تیره، وجود کلونیهای اریتروئیدی را ثابت کرد.

شکل ۳ نمایی از کلونیهای بنزیدین مثبت را در روز ۱۴ کشت در محیط نیمه‌جامد نشان می‌دهد.

بحث

این مطالعه با هدف توانایی تمایز سلولهای بنیادی جنینی موشی Royan B1 به سلولهای خونساز در محیط کشت انجام گرفت. بیشترین مطالعات گذشته بر تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای خونساز با کمک سلولهای استرومایی انجام گرفته است. سلولهای تغذیه‌کننده با آزاد کردن فاکتورهای محلول نامشخصی و نه با القای برهمکنش سلول - سلول [۱۶]، باعث القای تمایز می‌شوند. رده سلولی استرومائی OP9 [۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰]، به علت عدم توان تولید M-CSF با استفاده از دستکاری ژنتیکی سبب تمایز بیشتری در سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای خونساز نسبت به سایر سلولهای استرومایی مغز استخوان دست نخورده می‌شود [۲۱]. در این مطالعه از هیچ یک از سلولهای تغذیه‌کننده استفاده نشد و تمایز این سلولها در محیط کشت مایع انجام گرفت. از جمله مزیتهای این روش کشت در مقایسه با سایر روشهای تمایز آن است که در روشهای دیگر مانند استفاده از یک لایه تغذیه‌کننده برای حمایت از تمایز سلولهای بنیادی جنینی، فاکتورهای تمایزدهنده مترشحه از سلولهای تغذیه‌کننده مشخص نشده و مورد بررسی قرار نمی‌گیرند؛ این در حالی است که در این روش می‌توان اثر هر یک از فاکتورهای رشد را در محیط مایع بررسی کرد و از آن طریق به مکانیسمهای مولکولی انتقال‌دهنده پیام در داخل سلول پی برد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، ون جی زانگ (Wen Jie Zhang) و همکاران [۱۴] به مقایسه دو متد عمده مورد استفاده در تمایز سلولهای بنیادی جنینی موش به سلولهای خونساز پرداختند. آنها با مطالعه تمایز سلولهای

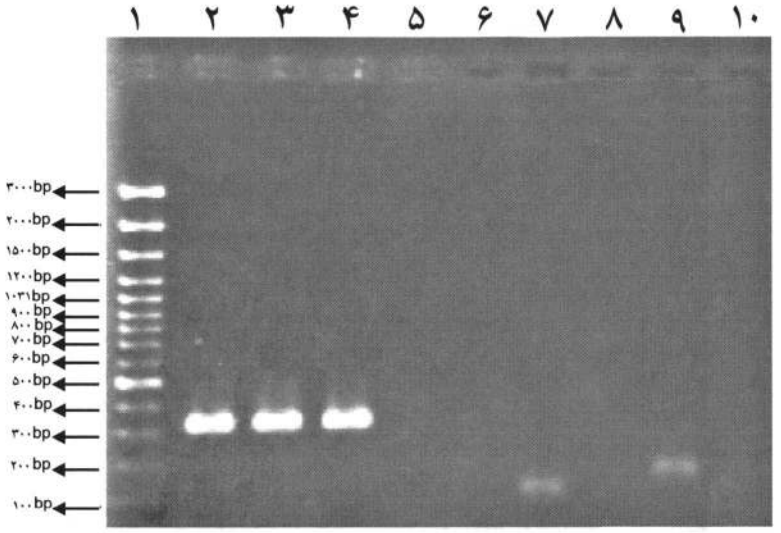
بنیادی جنینی در زمانی که از سلولهای تغذیه‌کننده استرومایی OP9 به عنوان عامل القاکننده تمایز استفاده کردند، دریافتند که سلول بنیادی اجدادی رده‌های اندوتلیالی - خونی (همانژیوبلاست) با این روش تمایز میل بیشتری برای تمایز به رده اندوتلیالی نسبت به رده خونساز دارد و این در حالی بود که با استفاده از همان رده سلول بنیادی که با روش تشکیل EB، القای تمایز شده بود، درصد سلولهای خونساز ایجاد شده بیش از رده اندوتلیالی بود و این موضوع نشان داد که روش دوم بازدهی بیشتری در ایجاد رده خونساز دارد. در مطالعه حاضر هم که با استفاده از تشکیل EB و القای جهت‌دار سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای خونساز انجام گرفت در هیچ‌یک از تکرارهای کشت، سلولهای اندوتلیالی دیده نشد. استفاده از سیستم تشکیل EB می‌تواند در مقایسه با روش دیگر دارای برتریهای مهمی باشد، از جمله آنکه در این روشها برای تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای خونی در مقیاس زیاد به منظور استفاده در مصارف محتمل کلینیکی مناسبتر است [۲۲]. در مجموع مطالعه تمایز سلولهای بنیادی جنینی به سلولهای خونساز با استفاده از فاکتورهای رشد مشخص می‌تواند در به‌دست آوردن یک دید جامع از نیازهای سلولهای بنیادی جنینی برای تمایز جهت‌دار، نقش مهمی داشته باشد.

References

1. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
2. **Martin GR.** Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1981; 78: 7634-8.
3. **Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R.** The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 1985; 87: 27-32.
4. **Smith AG, Nichols J, Robertson M, Rathjen PD.** Differentiation inhibiting activity (DIA/LIF) and mouse development .Dev Biol 1992; 151: 339-51.
5. **Haar, J. L., and G. A. Ackerman.** Ultrastructural changes in mouse yolk sac associated with the initiation of vitelline circulation. Anat Rec 1971; 170: 437-55.
6. **Moore, M. A., D. Metcalf.** Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. Br J Haematol 1970; 18: 279-96.
7. **Wong, P. M., S. W. Chung, C. J. Eaves, D. H. Chui.** Ontogeny of the mouse hemopoietic system. Prog Clin Biol Res 1985; 193: 17-28.
8. **Nakano T, Kodama H, Honjo T.** Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science 1994; 265: 1098-101.
9. **Keller G, Lacaud G, Robertson S.** Development of the hematopoietic system in the mouse. Exp Hematol 1999; 27: 777-87.
10. **Keller GM.** In vitro differentiation of embryonic stem cells. Curr Opin Cell Biol 1995; 7: 862-9.
11. **Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV.** Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. Mol Cell Biol 1993; 13 (1): 473-86.
12. **Palacios R, Golunski E, Samaridis J.** In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92(16): 7530-4.
13. **Ogawa M, Kizumoto M, Nishikawa S, Fujimoto T, Kodama H, Nishikawa SI.** Expression of alpha 4-integrin defines the earliest precursor of hematopoietic cell lineage diverged from endothelial cells. Blood 1999; 93(4): 1168-77.
14. **Zhang WJ, Park C, Arentson E, Choi K.** Modulation of hematopoietic and endothelial cell differentiation from mouse embryonic stem cells by different culture conditions. Blood 2005; 105: 111-4.
15. **Baharvand H, Matthaei K.** Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from C57BL/6 and BALB/c mouse strains. In vitro cell Dev Biol Animal 2004; 40: 76-81.
16. **Tian X, Morris JK, Linehan JL, Kaufman DS.** Cytokine requirements differ for stroma and Embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. Exp Hematol 2004; 32: 1000-9.
17. **Kodama H, Nose M, Niida S, Nishikawa S, Nishikawa S.** Involvement of the c-kit receptor in the adhesion of hematopoietic stem cells to stromal cells.

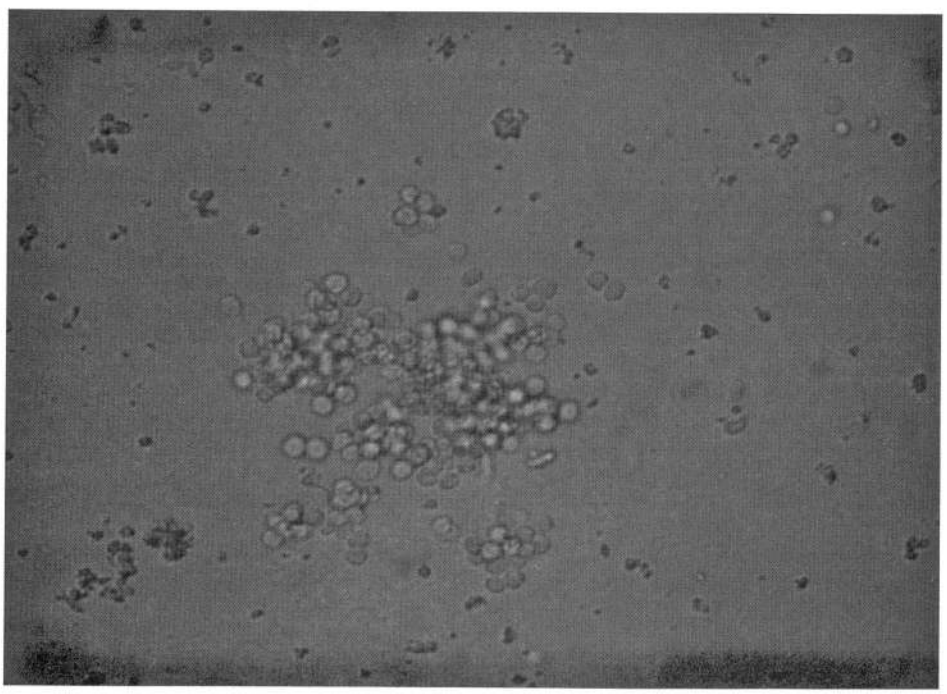
Exp Hematol 1994; 22: 979-84.

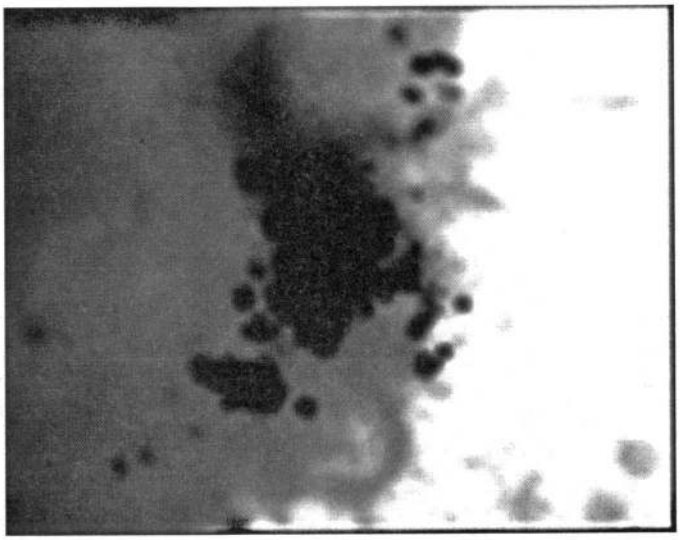
18. **Nakano T.** In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis. Int J Hematol 1996; 65: 1-8.
19. **Nakano T, Kodama H, Honjo T.** In vitro development of primitive and definitive erythrocytes from different precursors. Science 1996; 272: 722-4.
20. **Takakura N, Kodama H, Nishikawa S, Nishikawa S.** Preferential proliferation of murine colony-forming units in culture in a chemically defined condition with a macrophage colony-stimulating factor-negative stromal cell clone. J Exp Med 1996; 184: 2301-9.
21. **Movassagh Pour AA, Salehnia M, Pourfatollah AA, Soleimani M.** CFU-GM Like Colonies Derived from Embryonic Stem Cells Cultured on the Bone Marrow Stromal Cells Iranian Biomedical Journal 2004; 8: 1-5
22. **Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW.** Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. Biotechnol Bioeng 2002; 78: 442-53.



شکل ۱. ازمون RT-PCR باندهای تشکیل شده از سمت چپ ژل الکتروفورز به راست به ترتیب شامل:
باند ۱: Size marker , باند ۲: β-Tublin (Royan B1) , باند ۳: β-Tublin (differentiated Es cells)
باند ۴: OCt-4 (Royan B1) , باند ۵: OCt-4 (differentiated ES cells) , باند ۶: α-like chain (Royan B1)
باند ۷: α-like chain (differentiated ES cells) , باند ۸: β-like chain (Royan B1) , باند ۹: β-like chain (differentiated ES cells)
باند ۱۰: Neg. RT

شکل ۲. آزمون سنجش کلونی (Colony assay)
این تصویر تشکیل کلونی را در روز دهم در محیط کشت نیمه‌جامد متیل سلولز نشان می‌دهد. بزرگنمایی: ۱۰۰×





شکل ۳. کلونیهای حاصل از کشت سلولهای بنیادی جنینی در محیط نیمه‌جامد القاکننده خونسازی. رنگ‌آمیزی: بنزیدین، بزرگنمایی: ۱۰۰×