

TEMEL ARAŐTIRMA TEKNİKLERİ



4.HAFTA

Hücre kültüründe fiziksel, kimyasal ve biyolojik parametreler, kültür ortamının özellikleri, çoğalma kinetiği ve popülasyon katlanması; besiyerlerinin özellikleri

Prof. Dr. Eser ELÇİN

HÜCRE KÜLTÜRÜNDE FİZİKSEL, KİMYASAL VE BİYOLOJİK PARAMETRELER

Kültür koşulları her hücre tipi için farklılık göstermektedir, fakat genel olarak hücrelerin kültüre edildiği yapay çevre; temel besinleri, büyüme faktörlerini, hormonları ve gazları içeren uygun ortamı içermekte ve fizikokimyasal çevreyi düzenlemektedir. Çoğu hücre destek-bağımlıdır ve mutlaka bir katı veya yarı-katı substrata tutunmaları gereklidir. Bazı hücre tipleri de besiyeri içerisinde yüzerler.



HÜCRE KÜLTÜR KABİNİ KULLANIM ŞARTLARI

Hücre kültür kabini bir kişi tarafından kullanılacak kadar büyük olmalı, içi ve dışı kolay temizlenebilir ve yeteri kadar aydınlık olmalıdır. Çalışma alanı her zaman temiz tutulmalı ve düzenli olmalıdır. Hücre kültür kabinindeki maddeler %70'lik etanol ile temizlenmelidir.

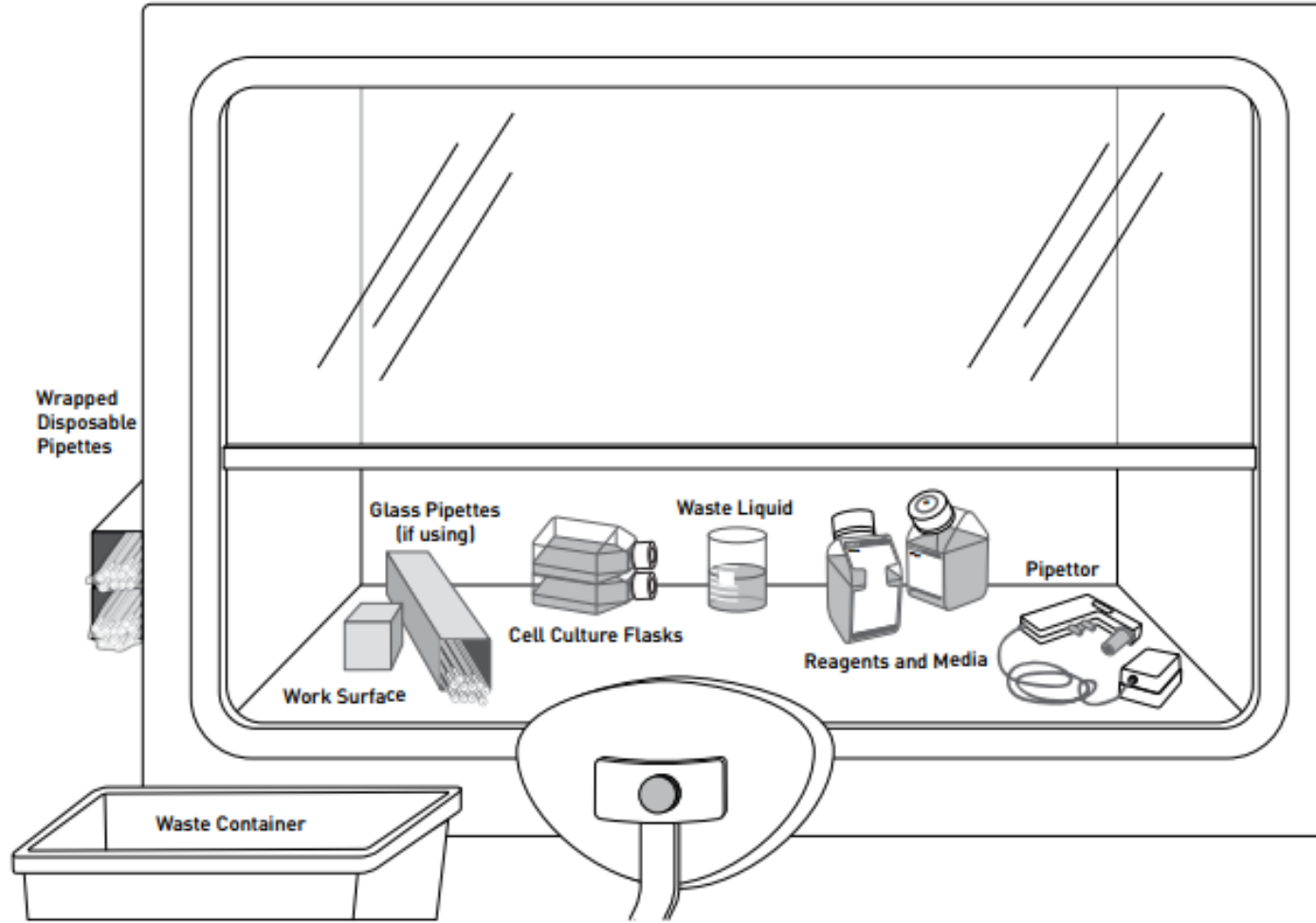
Geniş ve temiz çalışma alanı

Kolay ulaşma açısından pipetör sağda, cam pipetler solda olmalıdır

Ayıracılar ve besiyeri kolay pipetleme yapabilmek için biraz geride sağda bulunmalıdır

Sıvı atık için küçük bir atık kabı biraz geride ortada bulunmalıdır.

HÜCRE KÜLTÜR ORTAM ŞARTLARI



STERİL ÇALIŞMA ALANI

Uçuşan partiküllerin ve ayresollerin sebep olduğu kontaminasyonu azaltmanın en kolay ve ekonomik yolu hücre kültür kabinin kullanımınıdır.

Rutin temizlik için, çalışma alanı çalışmadan önce ve sonra %70'lik etanol ile silinmelidir.

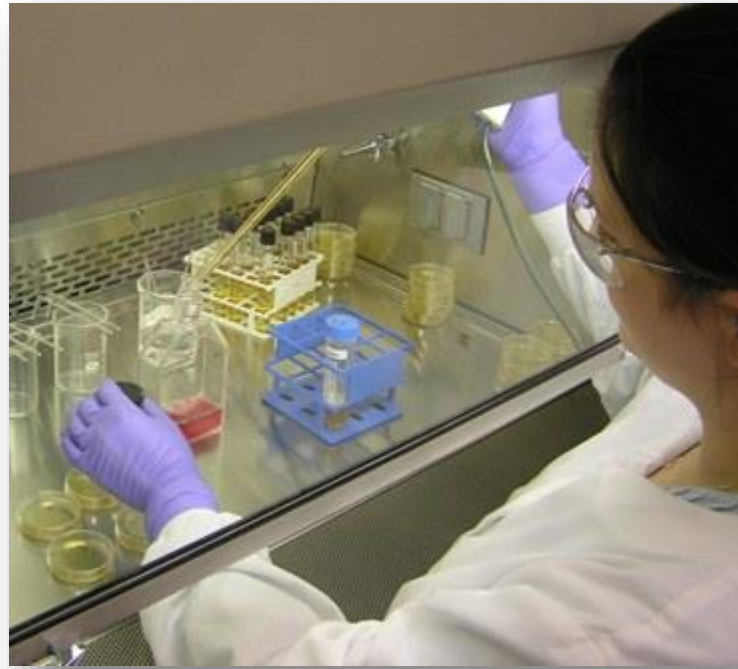
Kabin düzgün bir şekilde kurulmalı ve kapı ve pencerelerden uzak bir yere konulmalıdır.

Kullanımdan önce ve sonra, çalışma alanı dezenfekte edilmelidir.

Çalışma alanı düzenli olmalı ve sadece gerekli maddeleri içermelidir, depo alanı olarak kullanılmamalıdır.

İYİ PERSONEL HİJYENİ

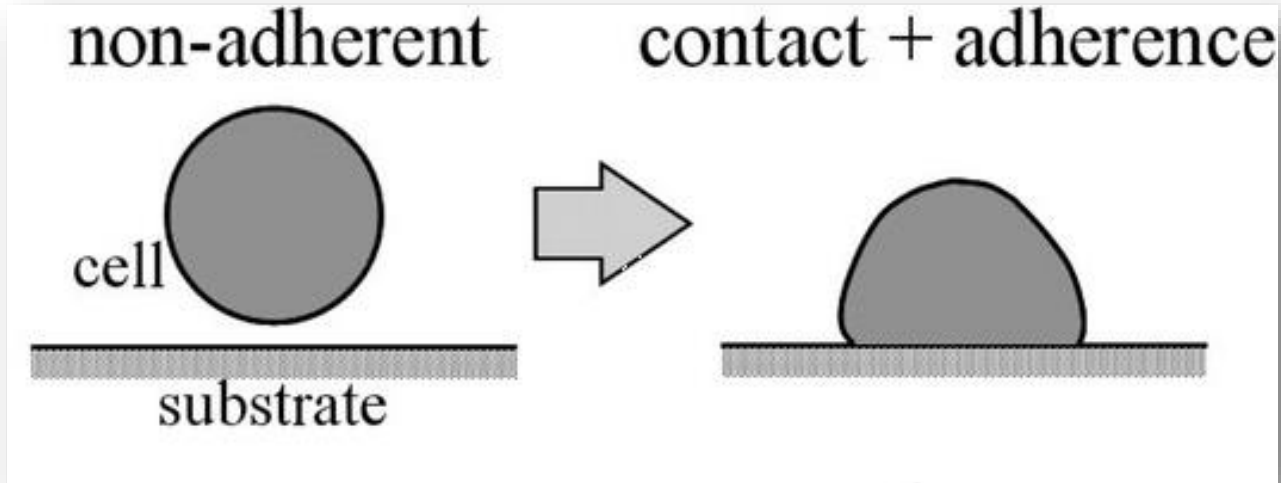
- ✓ Hücre kültürü ile çalışmadan önce ve sonra ellerinizi yıkayınız.
- ✓ Kendinizi zararlı maddelerden korumak ve cilt ve kıyafetlerden gelebilecek kontaminasyonu azaltmak için özel koruyucu kıyafetler giyiniz.



KÜLTÜR ORTAMI

YÜZEYE BAĞLI VE SÜSPANSİYON KÜLTÜR

- ✓ Omurgalılarından elde edilen hücrelerin çoğu, hemapoetik hücre soylarının büyük bir kısmı, desteğe bağlıdır ve yapışmaya izin verecek uygun sunstrat üzerinde kültüre edilmelidir.
- ✓ Buna rağmen, bazı hücre soyları süspansiyon kültüre de adapte olabilir.



BESİYERİ

Kültür besiyeri, hücre büyümesi için gerekli olan önemli besinleri, büyüme faktörlerini ve hormonları sağladığından dolayı kültür ortamındaki en önemli bileşendir. Üç temel besiyeri sınıfı bulunmaktadır: *Bazal besiyeri, serumu azaltılmış besiyeri ve serumsuz besiyeri.*

Serum

Serum, bazal besiyerinde hücre kültürü için gerekli olan büyüme ve adhezyon faktörlerinin, hormonların, yağların ve minerallerin kaynağı olarak önemlidir. Ayrıca, serum hücre membran geçirgenliğini düzenler ve lipitlerin, enzimlerin ve mikrobelerin taşıyıcısı olarak görev alır. Buna rağmen, serum kullanımının yüksek maliyet, standardizasyon problemleri, özgüllük, ve stimülasyon ya da hücre kültüründeki hücresel fonksiyonların inhibisyonu gibi dezavantajları bulunmaktadır.



Bazal besiyeri



Hücre hatlarının büyük bir kısmı aminoasitleri, vitaminleri, inorganik tuzları ve glukoz gibi karbon kaynaklarını içeren bazal besiyerinde iyi bir büyüme gösterirler. Ancak bu besiyerleri serum ile desteklenmelidir.

Serumu azaltılmış besiyeri

Serumun hücre kültür çalışmalarındaki istenmeyen etkilerini azaltmanın bir diğer yolu serumu azaltılmış besiyeri kullanmaktır. Bu besiyeri, serum ihtiyacını azaltan besinlerle ve hayvan-kaynaklı faktörlerle zenginleştirilmiştir.

Mammalian Cell Culture				
Cell Line	Cell Type	Species	Tissue	Medium*
293	fibroblast	human	embryonic kidney	MEM and 10% FBS
3T6	fibroblast	mouse	embryo	DMEM, 10% FBS
A549	epithelial	human	lung carcinoma	F-12K, 10% FBS
A9	fibroblast	mouse	connective tissue	DMEM, 10% FBS
AtT-20	epithelial	mouse	pituitary tumor	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS
BALB/3T3	fibroblast	mouse	embryo	DMEM, 10% FBS
BHK-21	fibroblast	hamster	kidney	GMEM, 10% FBS, or MEM, 10% FBS, and NEAA
BHL-100	epithelial	human	breast	McCoy's 5A, 10% FBS
BT	fibroblast	bovine	turbinate cells	MEM, 10% FBS, and NEAA
Caco-2	epithelial	human	colon adeno carcinoma	MEM, 20% FBS, and NEAA
Chang	epithelial	human	liver	BME, 10% calf serum
CHO-K1	epithelial	hamster	ovary	F-12, 10% FBS
Clone 9	epithelial	rat	liver	F-12K, 10% FBS
Clone M-3	epithelial	mouse	melanoma	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS
COS-1, COS-3, COS-7	fibroblast	monkey	kidney	DMEM, 10% FBS
CRFK	epithelial	cat	kidney	MEM, 10% FBS, and NEAA
CV-1	fibroblast	monkey	kidney	MEM, 10% FBS
D-17	epithelial	dog	osteosarcoma	MEM, 10% FBS, and NEAA
Daudi	lymphoblast	human	blood from a lymphoma patient	RPMI-1640, 10% FBS
GH1, GH3	epithelial	rat	pituitary tumor	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS

* BME: Basal Medium Eagle; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; FBS: Fetal Bovine Serum; GMEM: Glasgow Minimum Essential Medium; IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium; MEM: Minimum Essential Medium; NEAA: Non-Essential Amino Acids Solution.

Mammalian Cell Culture, continued				
Cell Line	Cell Type	Species	Tissue	Medium*
H9	lymphoblast	human	T-cell lymphoma	RPMI-1640, 20% FBS
HaK	epithelial	hamster	kidney	BME, 10% calf serum
HCT-15	epithelial	human	colorectal adenocarcinoma	RPMI-1640, 10% FBS
HeLa	epithelial	human	cervix carcinoma	MEM, 10% FBS, and NEAA (in suspension, S-MEM)
HEp-2	epithelial	human	larynx carcinoma	MEM, 10% FBS
HL-60	lymphoblast	human	promyelocytic leukemia	RPMI-1640, 20% FBS
HT-1080	epithelial	human	fibrosarcoma	MEM, 10% HI FBS, and NEAA
HT-29	epithelial	human	colon adenocarcinoma	McCoy's 5A, 10% FBS
HUVEC	endothelial	human	umbilical cord	F-12K, 10% FBS, and 100 µg/mL heparin
I-10	epithelial	mouse	testicular tumor	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS
IM-9	lymphoblast	human	marrow from myeloma patient	RPMI-1640, 10% FBS
JEG-2	epithelial	human	choriocarcinoma	MEM, 10% FBS
Jensen	fibroblast	rat	sarcoma	McCoy's 5A, 5% FBS
Jurkat	lyphoblast	human	lymphoma	RPMI-1640, 10% FBS
K-562	lymphoblast	human	myelogenous leukemia	RPMI-1640, 10% FBS
KB	epithelial	human	oral carcinoma	MEM, 10% FBS, and NEAA
KG-1	myeloblast	human	marrow from erythroleukemia patient	IMDM, 20% FBS
L2	epithelial	rat	lung	F-12K, 10%FBS
LLC-WRC 256	epithelial	rat	carcinoma	Medium 199, 5% horse serum
McCoy	fibroblast	mouse	unknown	MEM, 10% FBS
MCF7	epithelial	human	breast adenocarcinoma	MEM, 10% FBS, NEAA, and 10 µg/mL insulin
WI-38	epithelial	human	embryonic lung	BME, 10% FBS
WISH	epithelial	human	amnion	BME, 10% FBS
XC	epithelial	rat	sarcoma	MEM, 10% FBS, and NEAA
Y-1	epithelial	mouse	tumor of adrenal	F-10, 15% horse serum, and 2.5% FBS

Table 3
Components of Media

Components of Eagle's basal medium (BME)			
Amino acids	Vitamins	Inorganic salts	Other
Arginine	Biotin	CaCl ₂	D-Glucose
Cystine	D-Ca pantothenate	KCl	Phenol red
Glutamine	Choline	MgSO ₄	
Histidine	Folic acid	NaCl	
Isoleucine	i-Inositol	NaHCO ₃	
Leucine	Nicotinamide	NaH ₂ PO ₄	
Lysine	Pyridoxal HCl		
Methionine	Riboflavine		
Phenylalanine	Thiamine HCl		
Threonine			
Tryptophan			
Tyrosine			
Valine			
Additional components added in other media			
Amino acids	Vitamins	Inorganic salts	Other
Alanine	Ascorbic acid	Fe(NO ₃) ₃	HEPES
Asparagine	Biotin	KH ₂ PO ₄	Hypoxanthine
Aspartic acid	Cholesterol	MgCl ₂	Linoleic acid
Cysteine	Niacin	Na ₂ SeO ₃	Putrescine
Glutamic acid	p-aminobenzoic acid	CuSO ₄	Pyruvate
Glycine	Nicotinic acid	FeSO ₄	
Hydroxyproline	Pyridoxine	ZnSO ₄	
Proline		Ca(NO ₃) ₂	
Serine		KNO ₃	

Serumsuz besiyeri

Serumsuz besiyeri, çoğu birincil kültürde ve hücre hatlarında, çeşitli hibridoma hücre hatlarında, Sf9 ve Sf21 böcek hatlarında ve 293, VERO, MDCK, MDBK gibi viral üretim yapan hücre hatlarında bulunmaktadır. Serumsuz besiyeri kullanmanın en büyük avantajı, büyüme faktörlerinden uygun kombinasyonu seçerek besiyerini spesifik hücre tipleri için seçilebilir hale getirmektir.

Sıcaklık

- ✓ Hücre kültürünün optimal sıcaklığı hücrenin izole edildiği konakçının vücut sıcaklığına bağlıdır.
- ✓ Çoğu insan ve memeli hücre hattı optimal büyüme için 36°C ve 37°C'de sürdürülür.



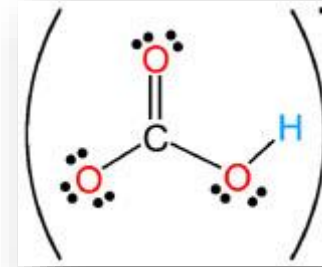
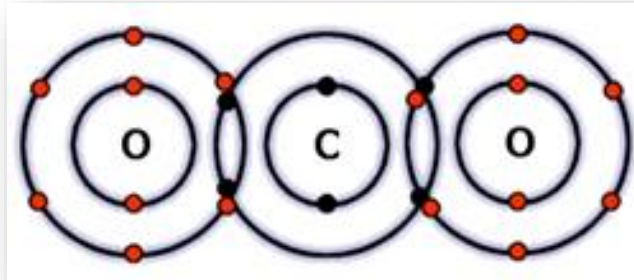
pH

Çoğu memeli hücre hattı pH 7.4'te daha iyi büyüme göstermektedir, ve farklı hücre gerilmeleri için çok küçük farklılıklar bulunmaktadır. Buna rağmen, bazı hücre hatları ise daha asidik ortamlarda daha iyi büyüme gösterirler (pH 7.0–7.4) ve bazı fibroblast hücre hatları daha temel ortamları tercih ederler (pH 7.4–7.7). Sf9 ve Sf21 gibi böcek hücre hatları ise pH 6.2'de optimal büyüme gösterirler.



CO₂

Büyüme besiyeri kültürün ph'sını kontrol eder ve ph değişikliğine karşı kültürü korur. Genellikle, bu tamponlama bir organikle (HEPES) ya da CO₂-bikarbonat bazlı tampon ile sağlanır. Çünkü besiyerinin ph'sı çözülmüş karbondioksit (CO₂) ve bikarbonat 'ın (HCO₃⁻) hassas dengesine bağlıdır, atmosferik CO₂ teki değişiklikler besiyerinin ph'sını değiştirebilir. Bu sebeple, CO₂-bikarbonat bazlı tampon ile tamponlanmış besiyeri kullanırken dış kaynaklı CO₂ kullanımı önemlidir. Çoğu araştırmacı genellikle havada % 5–7 CO₂ kullanmaktadır.

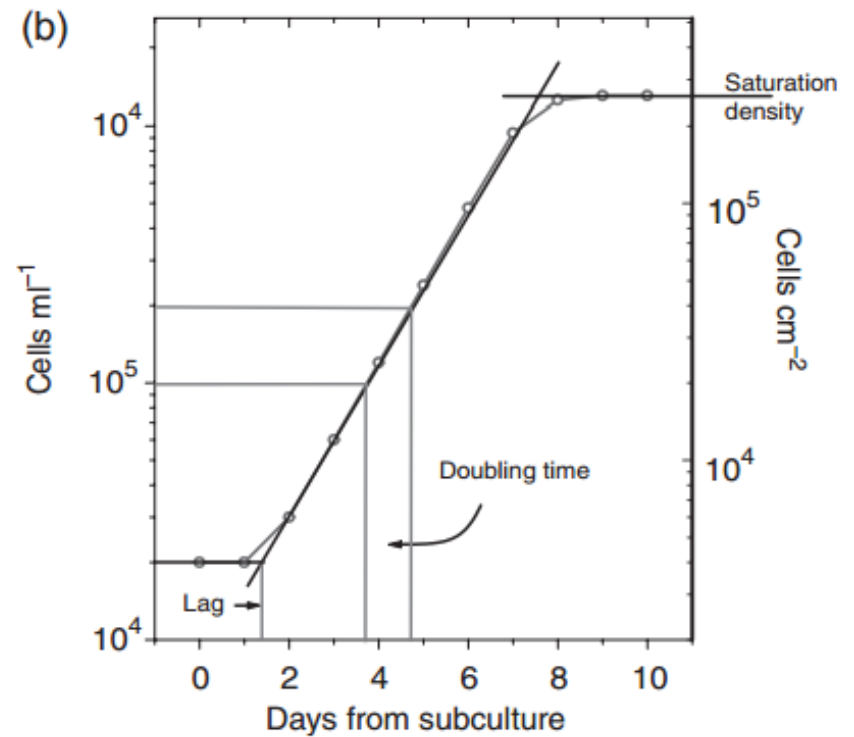
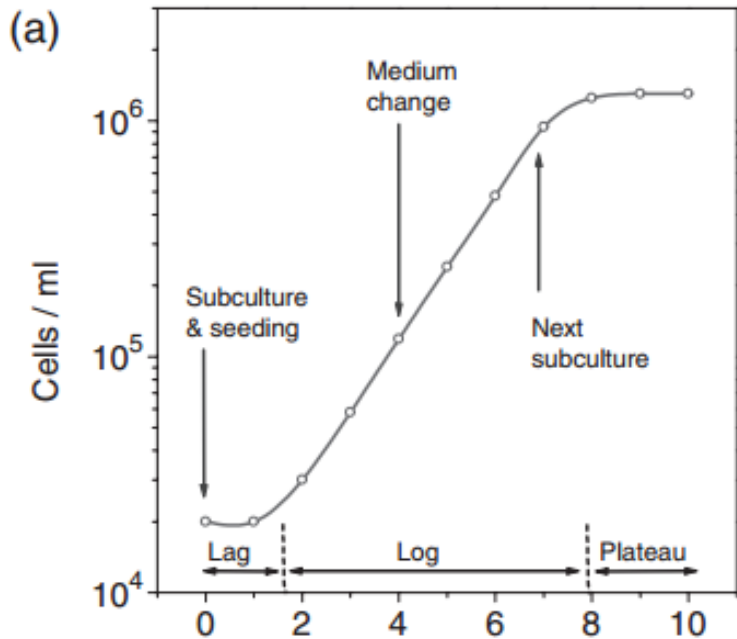


ÇOĞALMA KİNETİĞİ VE POPÜLASYON KATLANMASI

Bir hücre hattı alt kültüre alındığı zaman alt kültür yapılmadan önceki eski yoğunluğuna geri döner. Bu işlem büyüme döngüsü süresince belirli aralıklarla alınan örneklerden **büyüme eğrisi** çizerek tanımlanabilir.

Bu döngüde hücreler yeniden tohumlama sonrası **duraklama periyodu** adı verilen durgun periyotta büyüme göstermezler. Bu periyot 48 saate kadar sürer, fakat genelde 12-24 saat arasındadır, ve hücrelerin tripsinizasyon sonrası toparlanması, hücre iskeletlerinin yeniden yapılanması, bağlanabilmesi için gerekli matriksin salgılanması ve substrat üzerinde yayılması için gereken süredir.





Hücreler daha sonra ***katlanma zamanı*** olarak bilinen hücre popülasyonunun katlandığı ***logaritmik fazda*** katsal büyümeye geçerler. Hücre popülasyonu kalabalıklaştıkça ve bütün substrat kaplandıkça hücreler sıkışmaya başlar, yayılma azalır ve hücre döngüsünden ayrılırlar.

Hücreler, daha sonra, büyümenin sifıra yaklaştığı ***hareketsiz faza*** geçer. Bazı hücreler bu fazda farklılaşabilirler, diğerleri hücre döngüsünden çıkarlar fakat canlılıkları devam eder.

