

# TEMEL ARAŐTIRMA TEKNİKLERİ-II



*Prof. Dr. A. Eser ELÇİN*

## KRİYOPREZERVASYON

- Hücrelerin dondurma ve soğutma prosedürüdür. Hücreler özelliklerine göre bu prosedürler değişir.
- Amaç
- Elde edilen hücrenin o an kullanılmaması veya bir yerden bir yere taşınma işlemidir. Kriyoprezervasyon yaparken hücre canlılığında ve sayısında kayıp yapılması istenmemektedir.

## KRİYOPREZERVASYON

- Hücrelerin başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu yapılabilmesinin önemi;
- Primer hücre kültürü bozulmadan (pasaj sayısı artmadan) saklanması
- Hücre soylarının kontamine olmadan kullanılabilmesi

## KRİYOPREZERVASYON

- Kriyopektanlar nelerdir?
- DMSO
- Hes
- ....
-

## KRİYOPREZERVASYON

- Kriyoprotektan ajanlar (CPA) hücre içi sıvı ile yer değiştirip hücreyi hem içten hemde dıştan koruyan bir takım kimyasallardır.

## KRİYOPREZERVASYON

- **Kontrollü Dondurma** (yavaş) –düşük konsantrasyonlarda (1-1,5M) CPA kullanımı, kontrollü bir şekilde yavaş soğutma (0.3-1<sup>0</sup>C/dk), uzun süreli uygulama sonucu yaklaşık 3 saatlik dondurma prosedürünü bilgisayar programları içeren ekipmanlarla yapılmaktadır. Bu yöntem de hücrelerden çıkan hücre içi sıvısı, hücreler arasında donarak buz kristallerini şekillendirir.

## KRİYOPREZERVASYON

- **Şok Dondurma-** 1200-1250 °C/dk şok dondurma hızı ve 2-4,5 M CPA oranı uygulanmaktadır. Hücre dışı buz kristalleri şekillenerek olmaktadır.

## KRİYOPREZERVASYON

- Vitrifikasyon- hücre içi camsı –vitröz bir hal alır. Buz kristalleri hiç şekillenmez. 5-7 M gibi yüksek oranlarda CPA kullanılır.



# KRİYOPREZERVASYON

- ✓ Petri üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.
- ✓ Hücreler serumdan arındırılmak için steril PBS ile yıkanır.
- ✓ PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.
- ✓ Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilir.
- ✓ Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Üzerine 2-3 ml daha medyum ilave edilir.
- ✓ Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır.
- ✓ Pelet 1 ml besiyerinde sulandırılarak sayılır.
- ✓ Dondurma tüpleri içerisine 1:1 oranında dondurma medyumu ve hücre çözeltisi konur.
- ✓ Tüpler dondurma kabına yerleştirilir ve kap - 80 derin dondurucuya konur. 24 saat sonra dondurma tüpleri sıvı nitrojen tankına transfer edilir.

