

TEMEL ARAŐTIRMA TEKNİKLERİ

II



6,7,8 HAFTA

Hücre kültüründe temel işlemler:
besiyeri hazırlama, hücre ekimi,
besiyeri değiştirme, alt kültüre geçiş,
hücre sayımı, pasajlama,
kontaminasyon kontrolü, kültürün
sürdürülmesi ve takip edilmesi

Prof. Dr. Eser ELÇİN

Besiyeri Hazırlama

- Besiyeri kullanılmadan önce su banyosunun içinde (yaklaşık 10 dak) 37°C'ye ısıtılmalıdır. Besiyerinin içindeki bazı bileşenler (antibiyotik) uzun süre sıcakta beklemeye dayanıklı değildir.
- Genelde besiyeri için kullanılan maddeler ve oranları:
 - ✓ % 10 FBS (Fetal Sığır Serumu)
 - ✓ % 1 Pen-STREP (100 U penicillin/0.1 mg/mL streptomycin)
 - ✓ % 1 L-glutamin
 - ✓ Kalan kısım: Tercih edilen besiyeri (DMEM, α -MEM, DMEM-F12,..)

SERUM

- Serum pahalıdır. Her zaman porsiyonlanıp dondurularak saklanmalıdır.
- Besiyerine kullanmadan önce eklenir. Erimiş parçalar tekrar dondurulmadan buzdolabında bir süre saklanabilir.

Bilinmesi gerekenler:

Serumun yüzdesi: %5-20

Serumun tipi: Standart olan dana serumudur. Fetal dana serumunun tercih edildiği hücreler mevcuttur.

Isı ile inaktive edilmiş mi: Donmuş serum eritildikten sonra 56°C'de 30 dak tutulup inaktive edilir ve porsionlanıp tekrar dondurularak protokol tamamlanır.

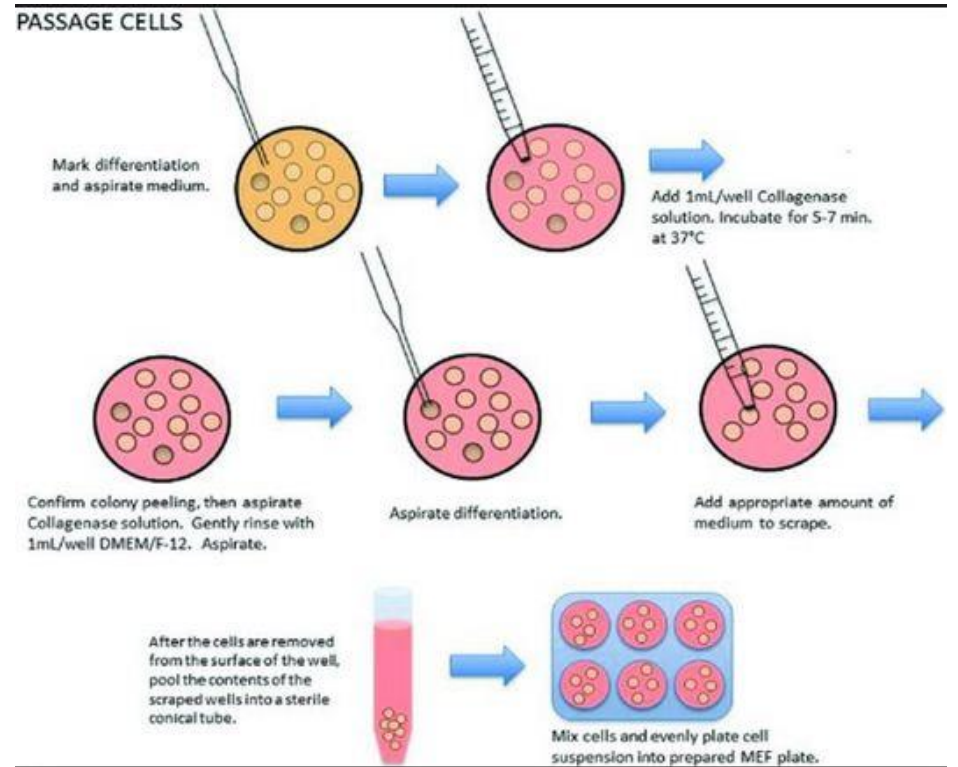
Besiyeri Deęiřimi

Devam eden kültürlerde besiyeri 2-3 gün aralıklarla taze besiyeri ile değiştirilmelidir. Besiyeri değiştirilirken pipet ucunun herhangi bir yere değmemesine ve atık kabının temiz olmasına dikkat edilmelidir. Taze besiyeri pipetle stoktan alınmamalı, kullanılacak kadarı başka bir kaba alınmalı ve buradan kullanılmalıdır. Farklı hücre tipleri için aynı pipet kullanılmamalı, sıklıkla pipet değişimi yapılmalıdır.

Besiyerinin rengi: Besiyerlerinin çoğunda pH indikatörü bulunur. Sarı ise asidite, mor gibi ise alkaliliği işaret eder. Besiyerinin çok bazik veya asidik olması kontaminasyonu, fazla üremiş kültürü, ölmüş kültürü, veya hatalı CO₂ lm veya verimini işaret eder.

ALT KÜLTÜRE GEÇİŞ

Çoğu zaman birincil kültürden elde edilen hücre sayısı nakil için yeterli olmayabilir. Alt kültüre alma, hücre popülasyonunu artırma, yüksek büyüme oranı elde etme, karakterizasyon için kültür çokluğu sağlama, dondurarak saklama ve deneme yapma şansı vermektedir. Sonuç olarak, alt kültüre alma, hücrelerin birbirinden ayrılmasına ve tek- hücre süspansiyonu elde etmeye olanak sağlar. Düşük konsantrasyonlu bu hücre süspansiyonunu yeniden ekim ikicil kültüre geçilmesini sağlar.



HÜCRE SAYIMI

Otomatik Hücre Sayıcı

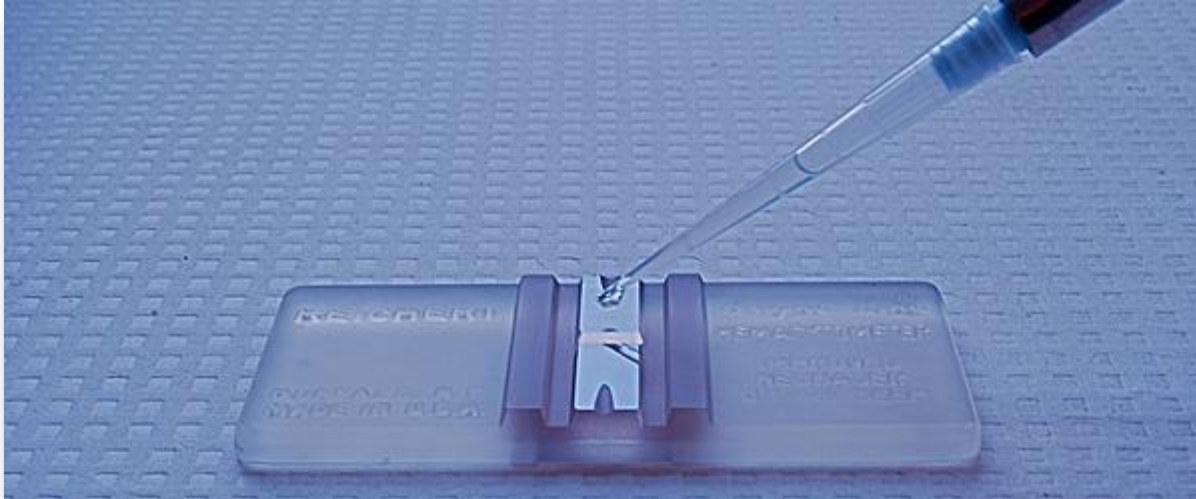
Hücre canlılığı testi için standart tripan blue tekniğini kullanan, dijital görüntü yakalayan, hücre sayımı, hücre boyutu ve hücre popülasyonundaki yüzde canlılık oranını veren sofistike görüntü analiz programıdır.



Figure 1—Countess™ Automated Cell Counter. The Countess™ Automated Cell Counter eliminates the tedium and subjectivity of manual cell counting. Automated counting frees up your time, reduces eye strain, and minimizes subjective judgments that can lead to error. It takes 3 simple steps: (A) Mix 10 μ L of sample with 10 μ L of trypan blue, and pipet into Countess™ chamber slide. (B) Insert slide into the instrument. (C) Press the “Count cells” button, and results are displayed in 30 seconds.

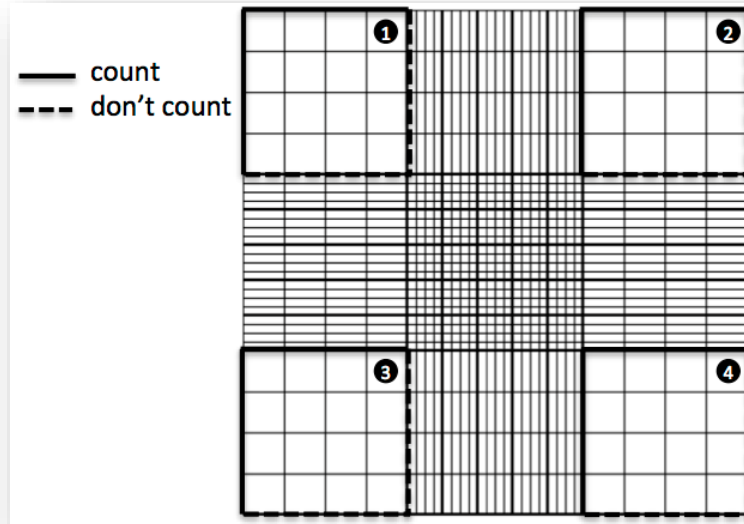
Otomatik Hücre Sayıcı-2

Cihaz, taze ve homojen hücre örneği ile en iyi sonucu vermektedir. Hücreler yaklaşık 1×10^6 hücre/mL konsantrasyon ile toplanır ve süspansiyon edilir. Hücreler eşit hacimdeki 0.4% trypan blue ile karıştırılır ve karışımdan alınan 10 μ L örnek tek kullanımlık chamber slidelere transfer edilir. Slide cihaz içerisine yerleştirilir ve ekrana gelen görüntü hemasitometredeki 4 tane 1 x 1 mm'lik kareye karşılık gelmektedir. Ardından, tek tuş yardımıyla görüntü analizi başlar ve toplam hücre/mL, canlı hücre/mL, ölü hücre/mL olarak sonuçlar ekranda çıkar.



Hemasitometre-1

Hemasitometre her biri 1 x 1 mm olan 9 kareye bölünmüş iki bölmesi olan, örgülü-cam lamların kullanıldığı bir metottur. Hücre süspansiyonu kapiler hareketlerle bölmeye doğru ilerler. Hücreler her 1 x 1 mm kare için 0.1 μ L olacak şekilde uzanır ve manuel olarak sayılır. Her kare için hesaplanan hücre sayısı ve seyreltme faktörü mililitredeki orijinal hücre konsantrasyonunu (hücre sayısı/ml) hesaplamak için kullanılır.

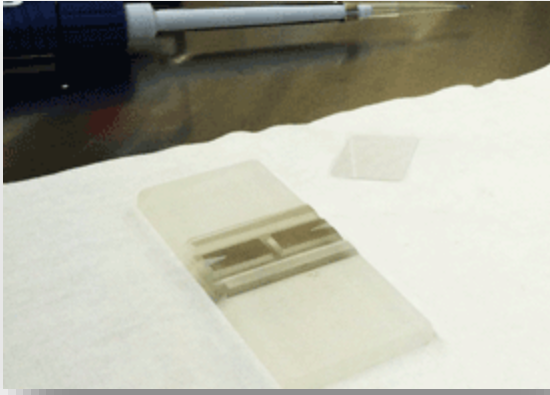


Hemasitometre-2

Mikroskopla chamber a bakıldığında, chamber daki hücre miktarı sayılarak belirlenebilir. Bütün hemasitometreler her biri 1 x 1 mm boyutunda 9 kare içeren 2 chamber içerir. Her karenin toplam hacmi $1.0 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm}$ ya da 0.1 mm^3 , ya da 10^{-4} cm^3 tür. 1 cm^3 1ml ye eşdeğerdir, ml' deki hücre konsantrasyonu ise ortalama her bir kare $\times 10^4$ 'tür. Eğer herhangi bir seyreltme varsa hücre konsantrasyonu hesaplanırken formüle ilave edilmelidir.

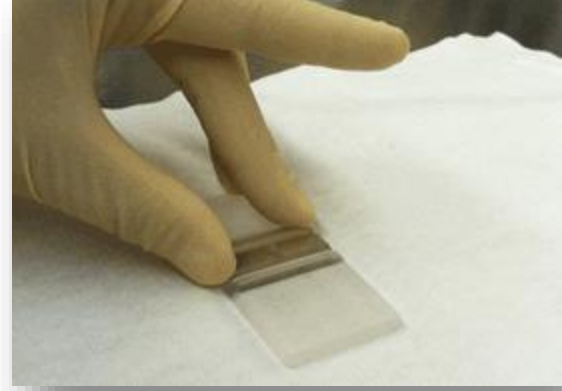
$$\text{Hücre Konsantrasyonu (Hücre/ml)} = (\text{Toplam hücre sayısı/karenin alanı}) \times 10^4$$

Step 1. Hemasitometreyi hazırla.

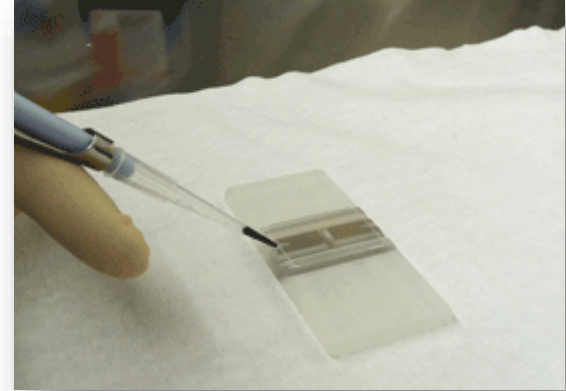


Hemasitometreyi temizle ve cover slipi 70% EtOH ile temizle.

Step 2. Örneği hazırla



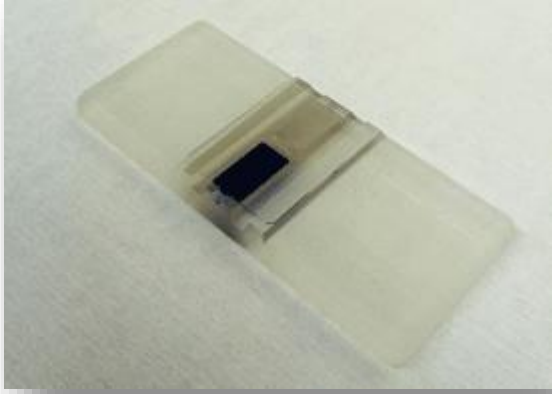
Cam cover slipi chamber slide'ın üzerine yerleştir.



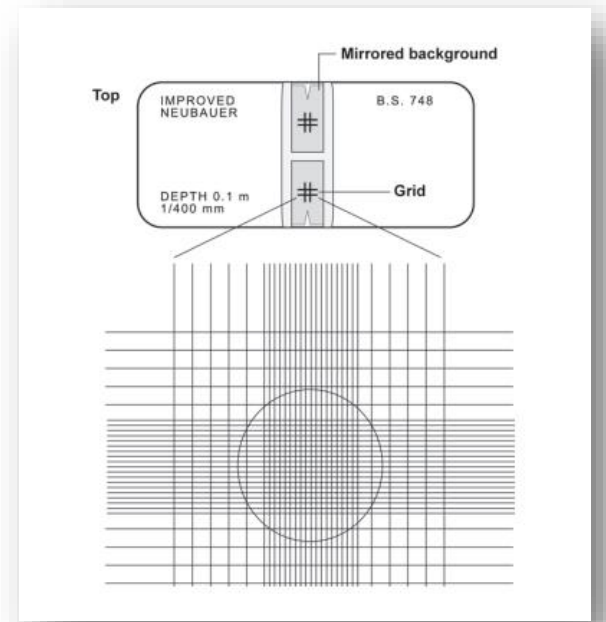
10 μ l hücre örneğini hemasitometreye yerleştir.

Prof. Dr. Eser ELÇİN

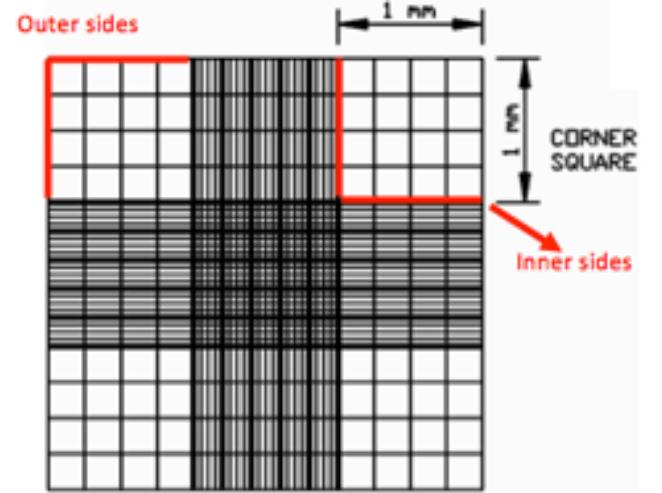
Step 3. Örnekteki hücreleri say.



Hemasitometreyi mikroskop altına yerleştir ve hücre sayımını yap.



Köşelerde bulunan dört büyük karedeki toplam hücre sayısını hesapla. Eğer hücreler köşe karelerdeki 4 çeper tarafına da dokunuyorsa , yalnızca iki taraftaki hücreleri say, 2 dış yan ya da iki iç yan.



Kontaminasyon sebebiyle kültür kaybı en yaygın hücre kültür problemlerinden biridir. Kültür kontaminasyonları biyolojik ya da kimyasal, görünür ya da görünmez, zararlı ya da yararlı olabilir fakat sonuçta sizin araştırmanızın kalitesini düşürür. Kontaminasyon problemleri 3 sınıfa ayrılabilir:

- ✓ **Küçük sıkıntılar:** Kaplar ya da flasklar kontaminasyon sebebiyle kaybedilebilir.
- ✓ **Ciddi problemler:** Kontaminasyon arttığında deney ya da hücre kültürü kaybedilebilir.
- ✓ **Büyük felaketler:** geçmiş ya da devam eden çalışmalar ile ilgili doğruluğunun sorgulanmasına sebep olabilir.



Büyük Hücre Kültür Kontaminasyonları

Kimyasal kontaminasyon

Kimyasal kontaminasyon, kültür sistemi üzerinde istenmeyen etkilere sebep olan bazı cansız maddelerin bulunmasıdır. Örneğin; çeşitli besinler yeterince yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermeye başlarlar.



Figure 1. Chemical contamination is often overlooked as a source of cell growth problems.

Potansiyel Kimyasal Kontaminasyon Türleri ve Kaynakları

Metal iyonları, endotoksinler ve besiyeri, serum ve suda ki diğer kirlilikler

Plastik tüp ve saklama şişelerindeki plastikleştiriciler

Triptofan, riboflavin ya da HEPES'in fotoaktivasyonu ile besiyerinde sebest radikallerin açığa çıkması

Cam malzeme ya da pipetlerde deterjanlar ya da dezenfektanlardan kalan tortular,

CO₂ inkübatöründe kullanılan gazlardaki kirlilik

Besiyeri

Kimyasal kontaminasyonların büyük bir kısmı hücre kültür besiyerinde bulunur ve reaktiflerden, sudan ya da serum gibi katkılardan gelir. Reaktifler her zaman yüksek kalite ve saflıkta olmalıdır. Üreticisi ya da daha önce bu ürünü kullanan araştırmacılar tarafından hücre kültür çalışmalarında kullanım için onaylı olmalıdır. Besiyeri hazırlama protokolündeki hatalar ve reaktif tartımı ise diğer kimyasal kontaminasyon sebepleri arasındadır.

Serum

Kimyasal ve biyolojik kontaminasyonların ortak sebeplerinden biri de besiyerinde kullanılan serumdur. Serum proteinleri, özellikle ağır metaller, kimyasal kontaminasyonun sebeplerinden biri olabilmektedir. Bu sebeple, serum içeren besiyerinden serumsuz besiyerine geçiş bu toksik kimyasal kontaminasyonların açığa çıkmasına sebep olabilir.

Su

Besiyeri hazırlamak için ve cam malzemelerin yıkanması için kullanılan su; kimyasal kontaminasyonun en önemli sebeplerinden biridir ve özel özen ister. Genel olarak, iki ya da üç cam destilasyonu hücre kültür besiyeri ve çözeltilerinde kullanılan yüksek kalitede ki su için en önemli kaynaktır.