

Hücre Kültürü ve İzolasyon Teknikleri

Prof. Dr. A. Eser ELÇİN

HAYVAN

BİTKİ

DOKU



PRİMER KÜLTÜR

SEKONDER KÜLTÜR

SAKLANMASI

SAKLANMASI

HÜCRE HATTI

DEVAMLI HÜCRE HATTI

FARE KEMİK İLİĞİ İZOLASYONU



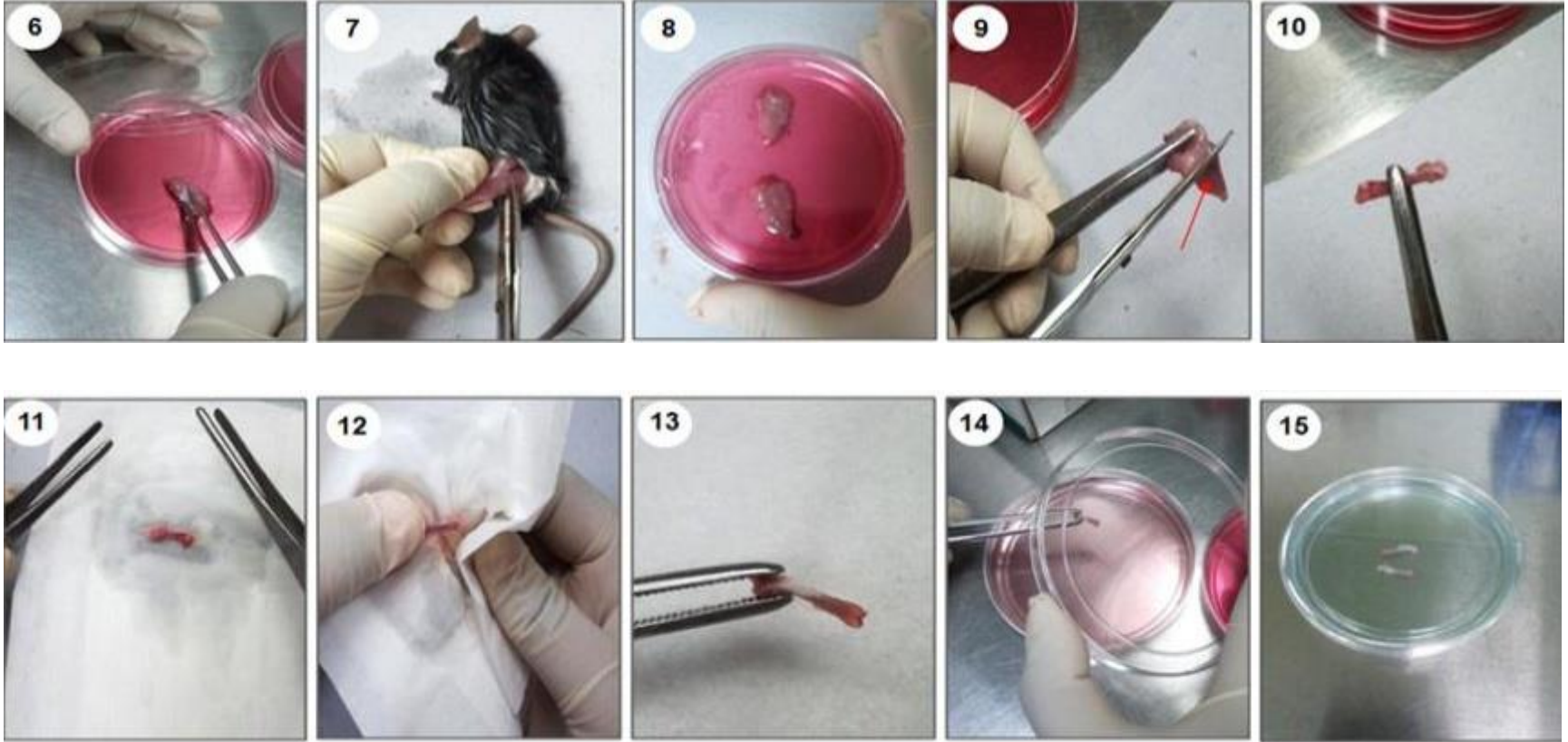
- ✓ Kemik iliği izolasyonunda kullanılacak olan deney hayvanı çeşitli anestezipler ile bayıltılır. Anesteziplerin dozu deney hayvanların kilo, yaş ve cinsiyetine göre değişmektedir.
- ✓ Dorsal veya ventral olarak yatırılan farenin kesilecek tarafı %70'lik etanol ile silinerek olası kontaminasyon engellenir.
- ✓ Steril cerrahi makas kullanılarak farenin femur başından ayrılma yapılır.

İNTRAVENÖZ ANESTEZİKLER

TÜRLER	Pentobarbital		Tiyopental		Ketamin HCl (a)		Üretan (b)		Ketamine/ Ksilazin		Alfaksalon/ Alfadolon (Saffan) (c)	
	mg/kg	uygulama yolu	mg/kg	uygulama yolu	mg/kg	uygulama yolu	mg/kg	uygulama yolu	mg/kg	uygulama yolu	mg/kg	uygulama yolu
Kobay	37	IP	20	IV	100-200	IM	1500	IV IP	40-100/ 4-5	IM/ IM SQ	40	IP
Hamster	50-90	IP	20-40	IV IP							150	IP
Fare	30-40	IP	30-40	IV IP	100-200	IM			200/ 10	IM/ IP	10-15	IV
Tavşan	45	IV	20	IV	50	IM	1000	IV IP	35-50/ 5-10	IM/ IV	6-9	IV
Sıçan	40	IP	20-40	IV IP	60-100	IM	1000	IP	90/ 5-10	IP IM/ IP IV	10-12	IV
Koyun	30	IV	15	IV	20	IM						
Keçi	30	IV	20	IV	15	IM						
Domuz	30	IV	6-8	IV	10	IM		IM IV	20/ 2	IM/ IV	2 5	IV IM

Canadian Council on Animal Care, Guide To The Care and Use of Experimental Animals

FARE KEMİK İLİĞİ İZOLASYONU

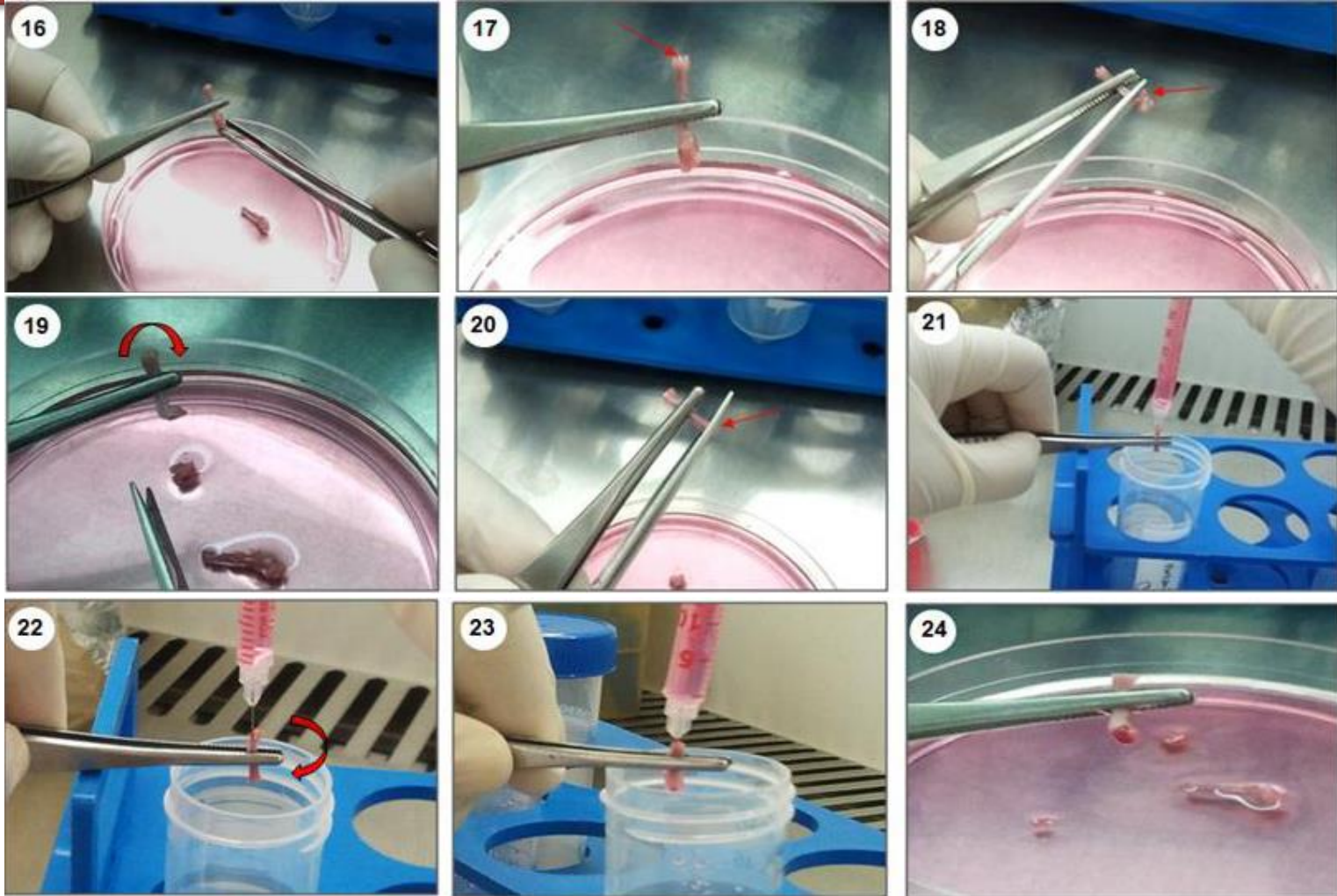


✓ Dissekte edilen femur ve tibia, önce makas yardımıyla sonrasında steril sargı beziyle kas ve yağdan ayrılır.

✓ Ayrılan kemik parçaları enfeksiyonları önlemek için 5-10 dk süreyle %70'lik etanol içerisine konulur.

Prof. Dr. Eser ELÇİN

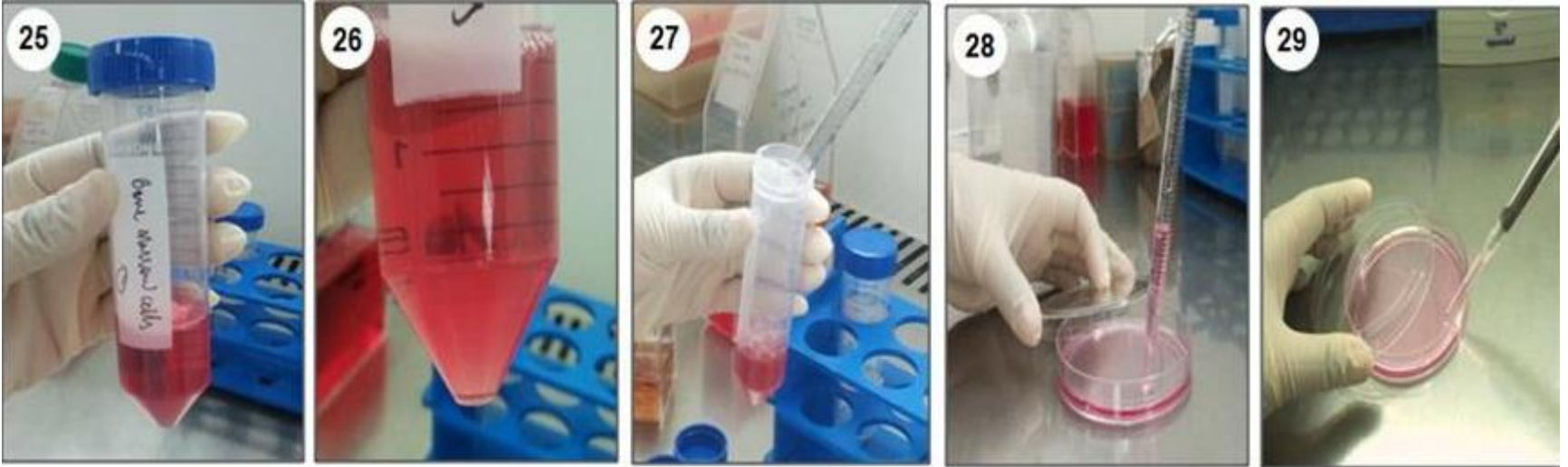
FARE KEMİK İLİĞİ İZOLASYONU



- ✓ Femur iki başından steril makasla kesilerek kemik iliğine ulaşım sağlanır.
- ✓ İnsulin şırıngası ve değişen G'lerdeki iğneler kullanılarak kemik iliği steril PBS/HBSS ile flush yapılır.
- ✓ Toplanan kemik iliği hücreleri 50 mL'lik tüplere aktarılır.

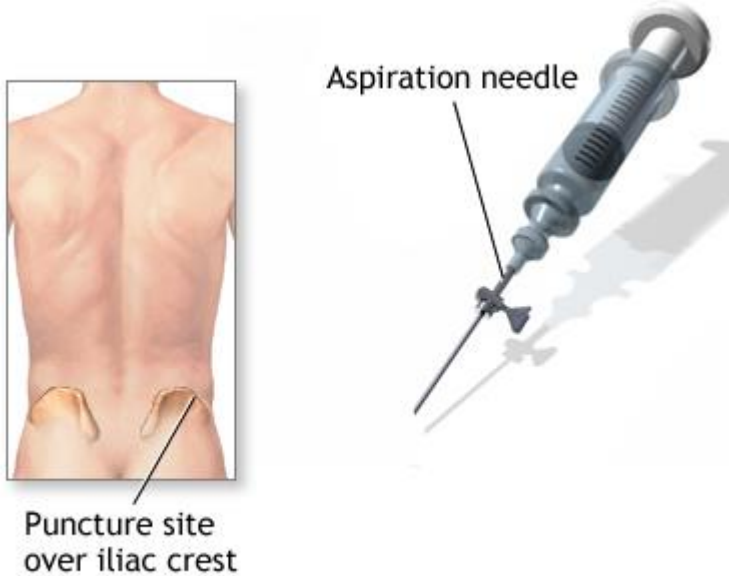
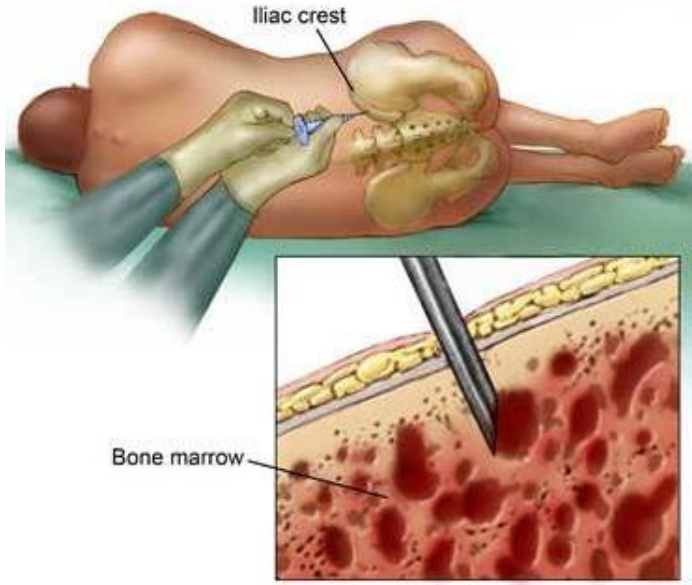
Prof. Dr. Eser ELÇİN

FARE KEMİK İLİĞİ İZOLASYONU



- ✓ BM hücre süspansiyonu santrifüj edilir.
- ✓ Santrifüj aşamasından sonra pellet kısmı alınarak hücre kültürü için hücre kültür kaplarına ekim yapılır. https://www.youtube.com/watch?v=Dnvq_wM22fl

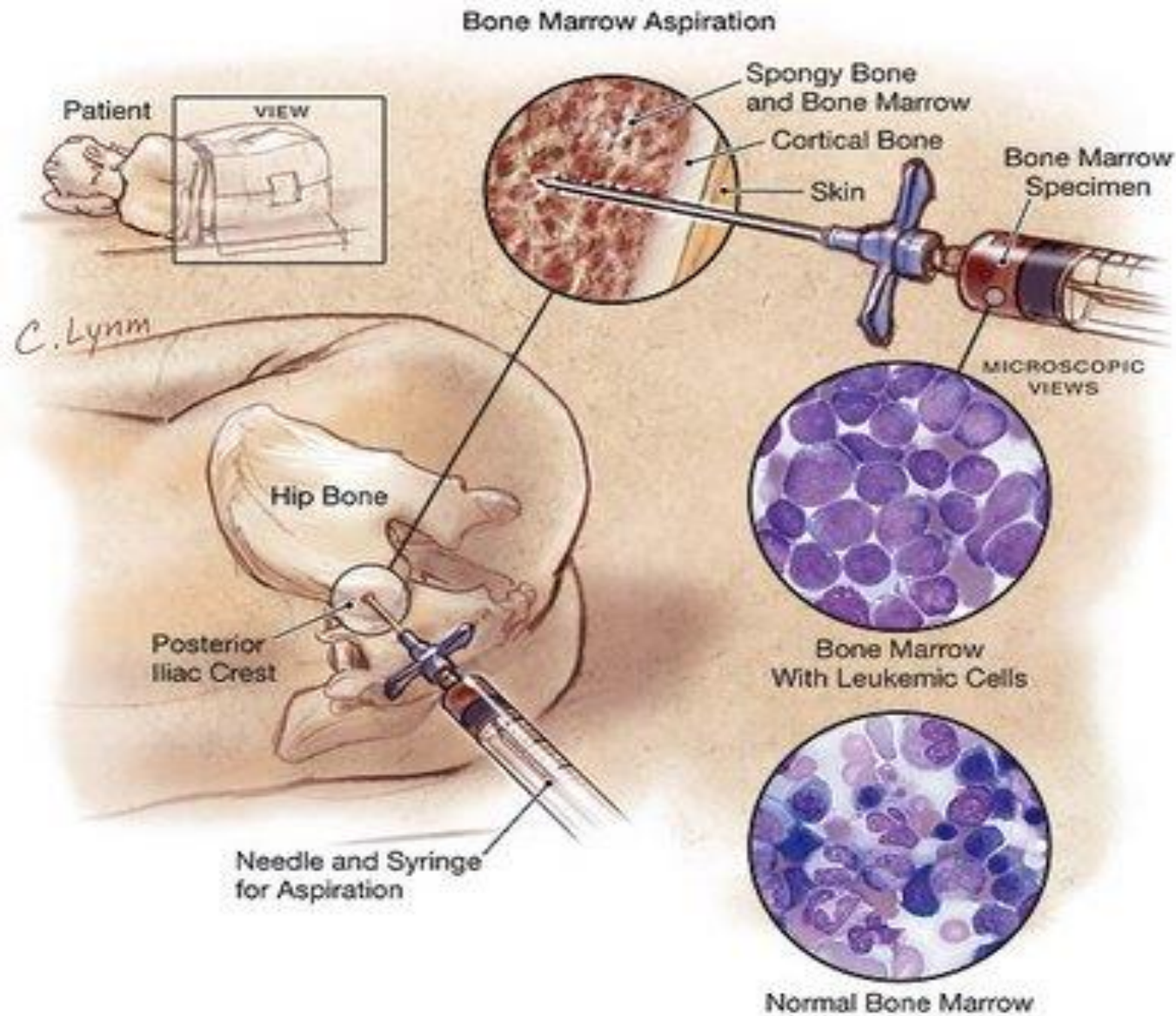
PERİFERAL KANDAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU



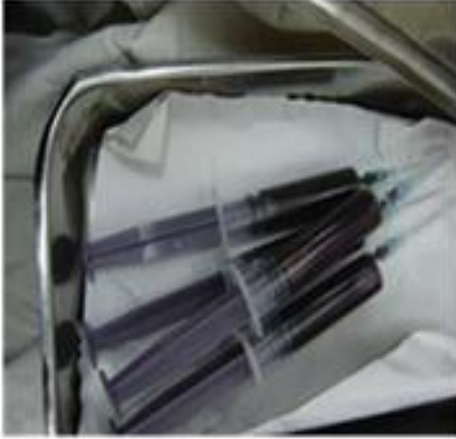
✓ Kemik iliğinde bulunan hücreler:

- Eritrositler
- Akyuvarlar
- Trombositler
- Hematopoetik Progenitörler
- Endotelyal Progenitörler
- Mezenkimal Kök Hücreler

PERİFERAL KANDAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU



PERİFERAL KANDAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU



Bone marrow aspirate



Sterile transport



Caminar flow hood sterility



The stem cells



Centrifugation



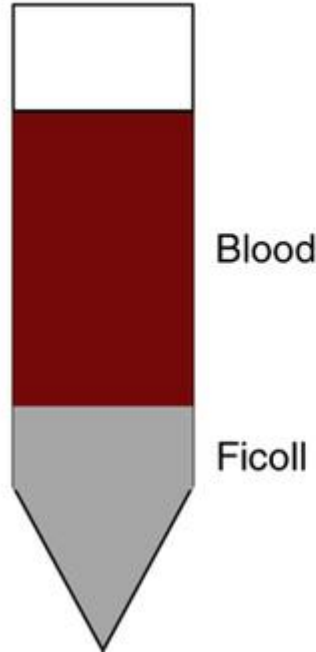
Ficoll layering

✓ Transplantasyon sırasında

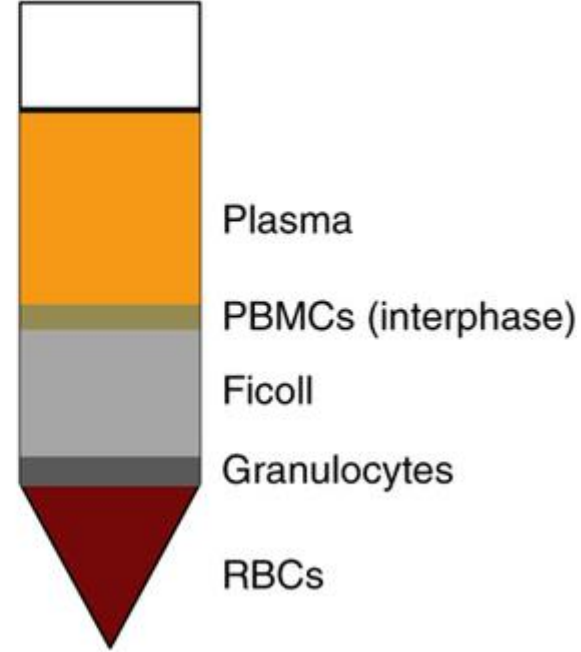
Prof. Dr. Eser ELÇİN

PERİFERAL KANDAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU

Layers before Ficoll spin



Layers after Ficoll spin



Ficoll ile periferel kandan mononükleer hücre izolasyonu:

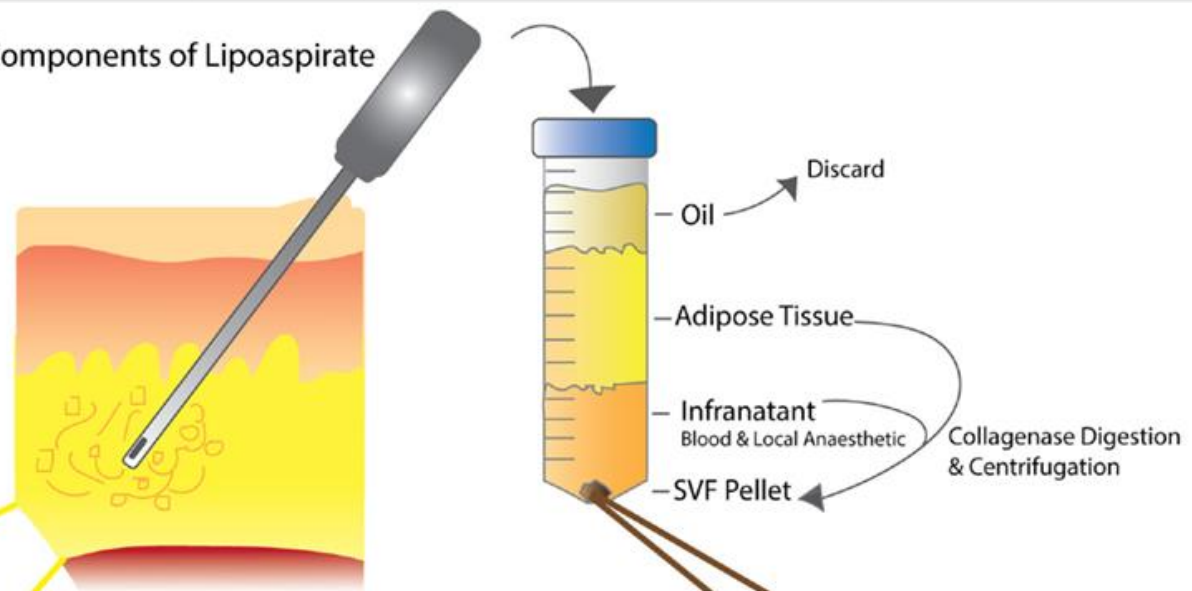
<https://www.youtube.com/watch?v=6lsldFFMEhE>

<https://www.youtube.com/watch?v=Ee3hu4PoBVs>

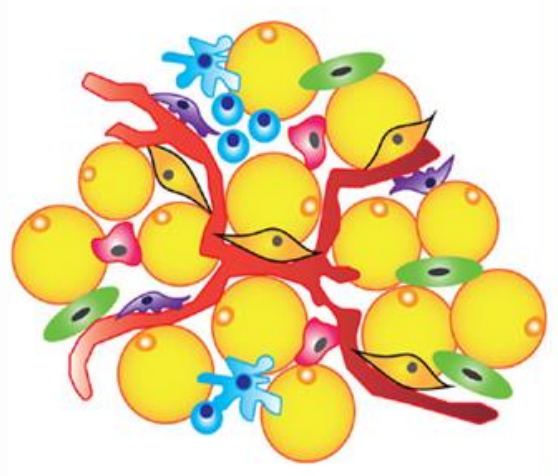
- ✓ Madaan A, Verma R, Singh AT, Jain SK, Jaggi M (2014) A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells. J Biol Methods 1(1):e1. doi: 10.14440/jbm.2014.12
- ✓ http://www.miltenyibiotec.com/~media/Files/Navigation/Research/Stem%20Cell/SP_MC_BM_density_gradient.ashx
- ✓ Pantel K, Brakenhoff H.K (2004) Dissecting the metastatic cascade. Nature Reviews Cancer 4, 448-456 (2004) | doi:10.1038/nrc1370
- ✓ Kumar A, Raj SNM, Mochi TB, Mohanty S, Seth T, Azad R. Assessment of Central Retinal Function after Autologous Bone Marrow Derived Intravitreal Stem Cells Injection in Patients with Retinitis Pigmentosa using Multifocal ERG: A Pilot Study. (2012)World J Retina Vitreous 2(1):5-13.







ADIPOZ DOKUDAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU

A Components of Lipoaspirate

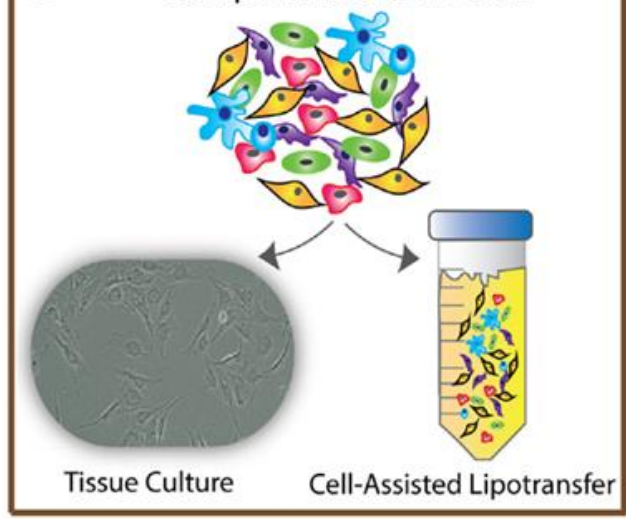


B Components of Adipose Tissue

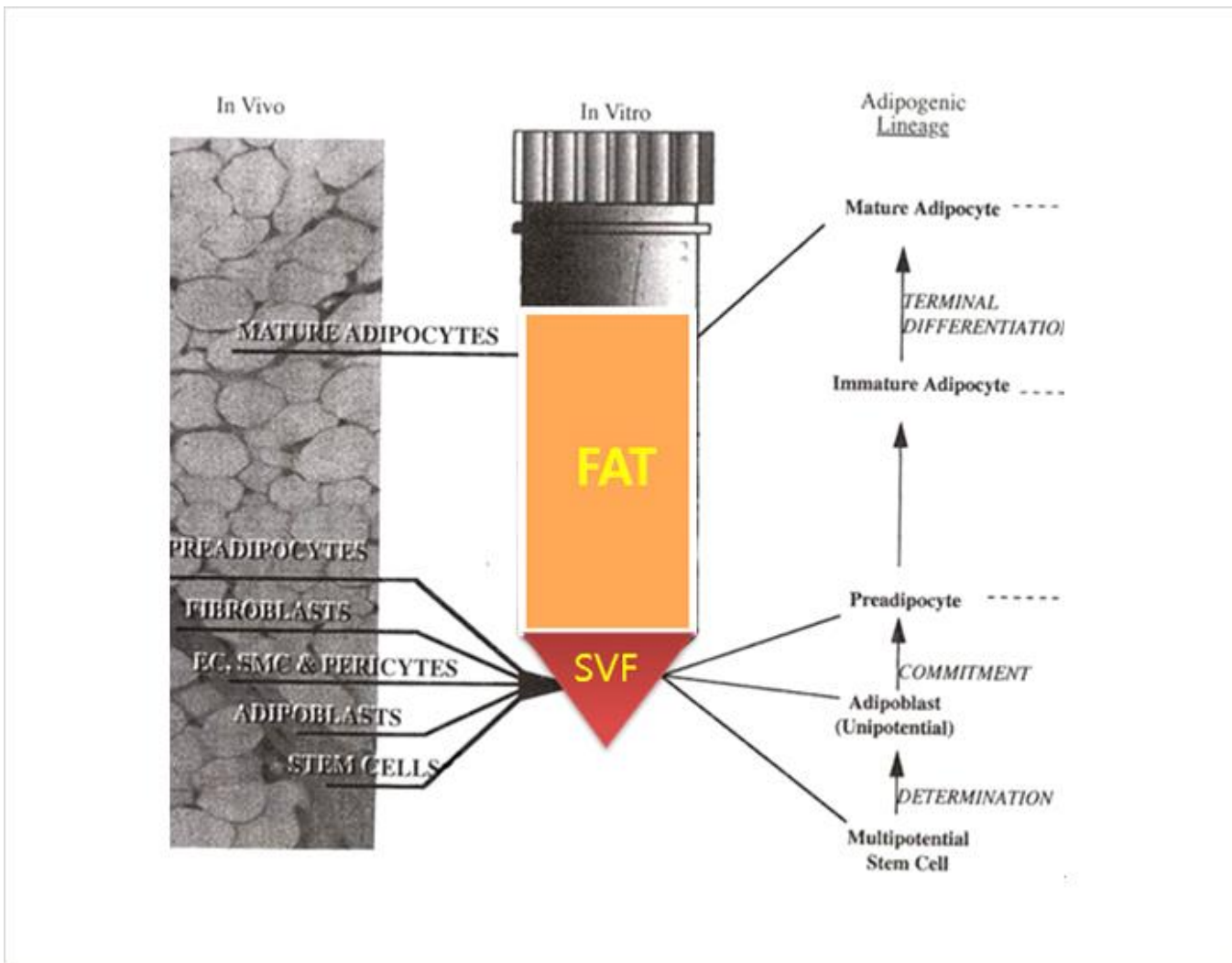


-  Pericytes
+ CD140b⁺, CD146⁺, NG2⁺
■ CD31⁻, CD34⁻, CD144⁻, vWF⁻
-  Adipocytes
-  Adipose Derived Stem Cells
+ CD13⁺, CD29⁺, CD34⁺, CD44⁺, CD90⁺, CD104a⁺
■ CD14⁻, CD31⁻, CD45⁻, CD106⁻, CD144⁻
? CD146⁻, αSMA⁻
-  Pre-Adipocytes
-  Endothelial & Progenitor Cells
+ CD31⁺, CD34⁺, CD90⁺, CD146⁺, VWF⁺
■ CD45⁻
-  Haematopoietic Cells
Monocytes/Macrophages

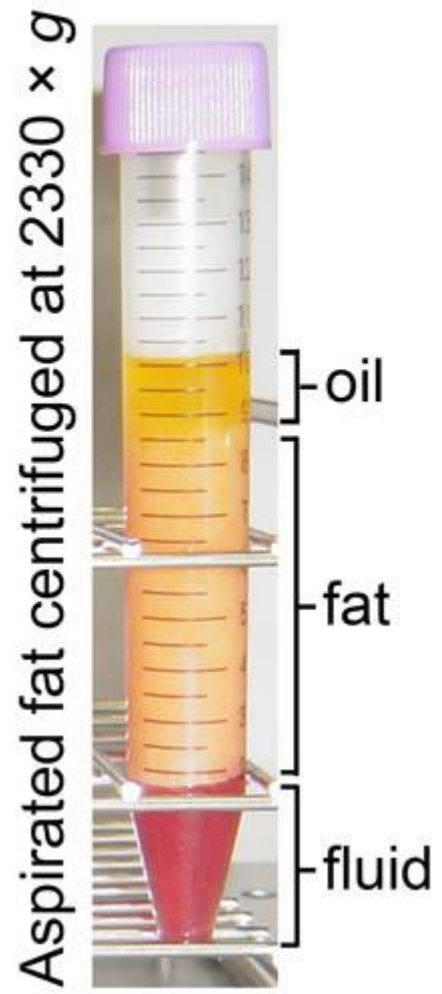
C Components of SVF Pellet



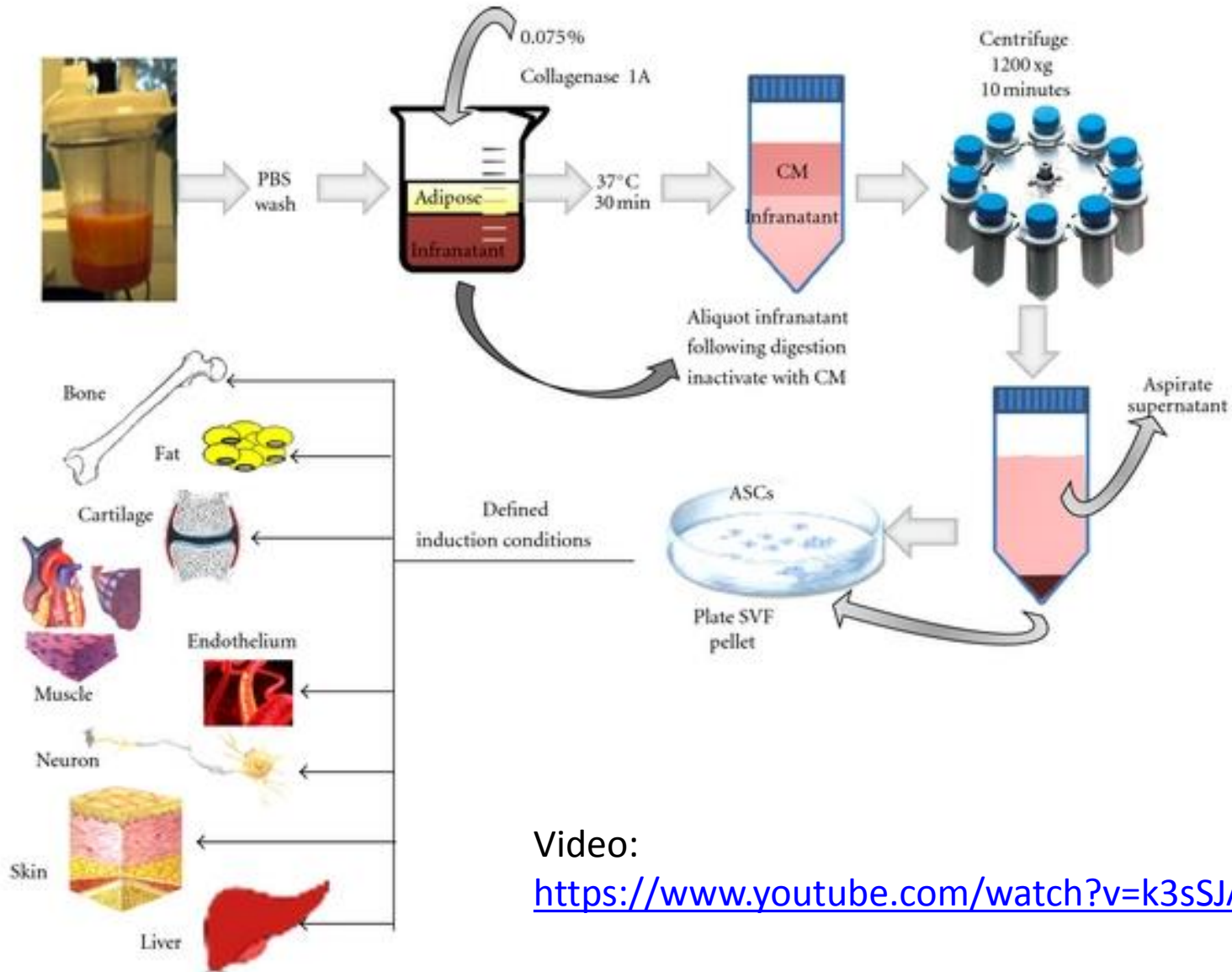
ADIPOZ DOKUDAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU



$$\text{oil ratio} = \frac{\text{oil}}{\text{oil} + \text{fat}}$$



ADIPOZ DOKUDAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE İZOLASYONU



EXPLANT HÜCRE KÜLTÜRÜ

Preparation and incubation of liver slices

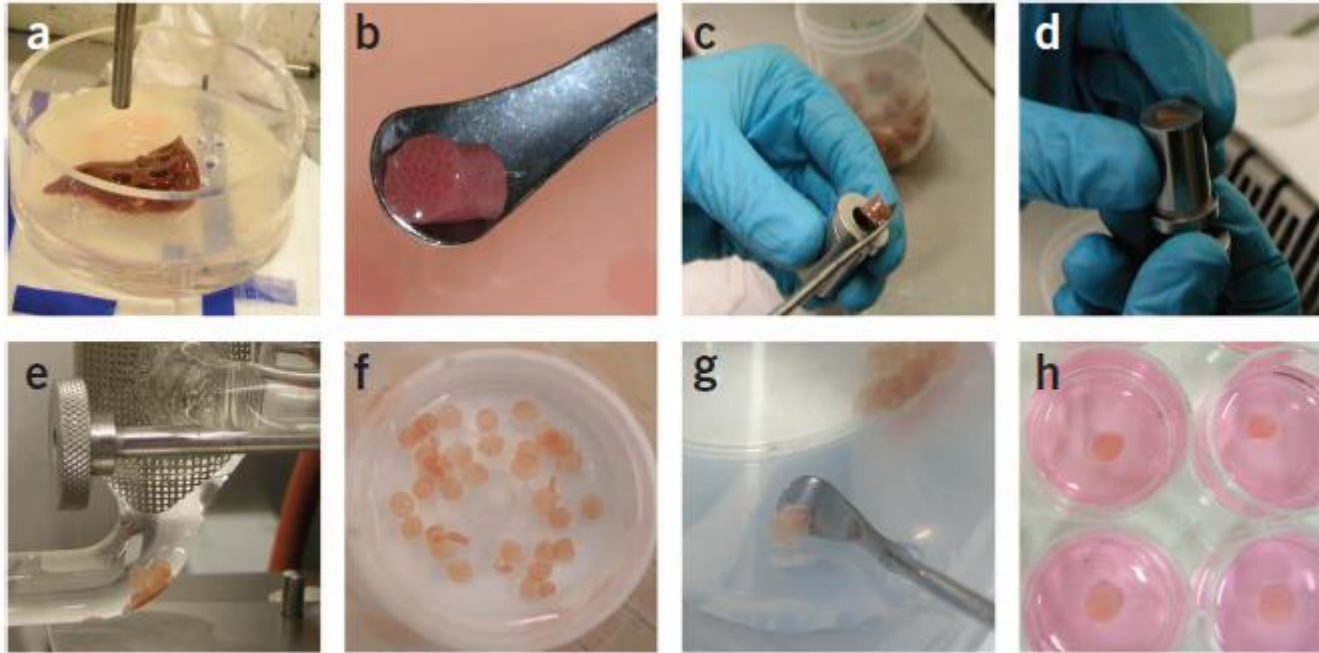


Figure 2 | Preparation and incubation of rat or human liver slices. Liver cores are prepared using a drill and a tissue coring tool (a), and transferred to the cylindrical core holder of the Krumdieck slicer (b–d). Thereafter, slices of 8 mm with 10–15 mg wet weight (or of other thickness and diameter) are cut (e). Good quality slices are round, equally thick at all sides and have smooth edges (f). Slices are transferred to 6- or 12-well plates using a spatula to avoid damaging the slices (g,h). Animal experiments and retrieval of human organ material were conducted in compliance with institutional and legislative regulations.

NATURE PROTOCOLS | VOL.5 NO.9 | 2010 | 1545

Prof. Dr. Eser ELÇİN

EXPLANT HÜCRE KÜLTÜRÜ

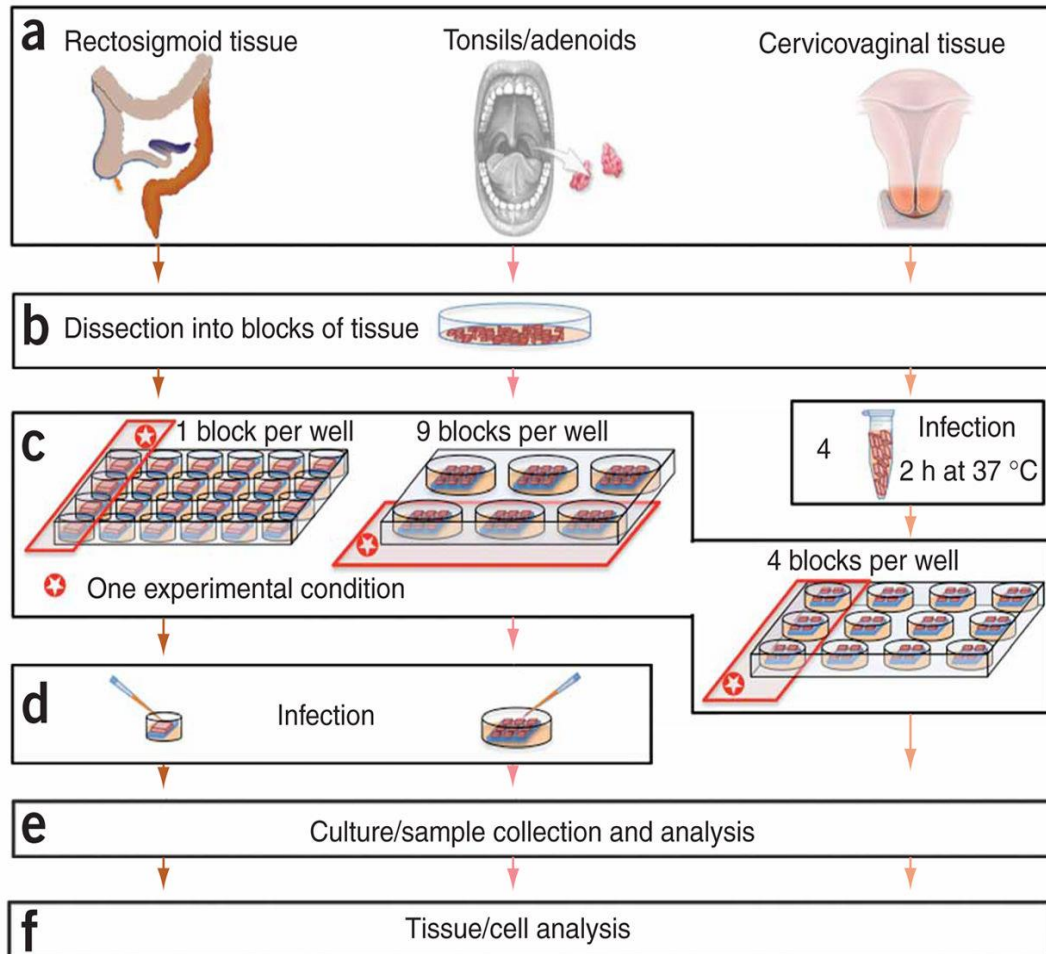


Figure 1.

Synopsis of explants culture setup. Six major stages of the protocol to set up human tissue explants to study human infectious agents: (a) Tissue (tonsils, lymph nodes, cervicovaginal, rectosigmoid) is obtained through surgery or from cadavers, and delivered to the laboratory; (b) tissue is dissected into small blocks; (c) blocks are placed at the medium–air interface on collagen rafts in appropriate culture vessels. (Note: the minimum number of wells that constitute an experimental condition is boxed in red on each culture plate and labeled with a \star ; the number of tissue blocks per well is indicated); (d) tissue is infected with a pathogen of interest (note that the modality and order of infection for cervical tissue is different from those of other tissues); (e) tissue is cultured for 2–3 weeks and samples of medium are collected periodically and analyzed for pathogen components and for various metabolites of interest; (f) at various time points, tissue blocks are collected and analyzed by use of flow cytometry or microscopy.

- L Shukla, W Morrison, R Shayan (2015). Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier, Front. Surg., doi: 10.3389/fsurg.2015.00001
- Patricia Zuk (2013). Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review, ISRN Stem Cells. Volume 2013 ,Article ID 713959, 35 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/713959>
- Jean-Charles Grivel and Leonid Margolis (2009). Use of human tissue explants to study human infectious agents, Nat Protoc. ; 4(2): 256–269.
doi:10.1038/nprot.2008.245.
- de Graaf IA, Olinga P, de Jager MH, Merema MT, de Kanter R, van de Kerkhof EG, Groothuis GM (2010). Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies; Nat Protoc. ;5(9):1540-51. doi: 10.1038/nprot.2010.111.

Hücre kültüründe izlenecek yollar:

- ✓ Hücre Pasajlaması
- ✓ Tripsinizasyon
- ✓ Hücre Sayımı
- ✓ Hücrelerin Dondurulması(Kriyoprezervasyon)
- ✓ Hücrelerin Çözülmesi

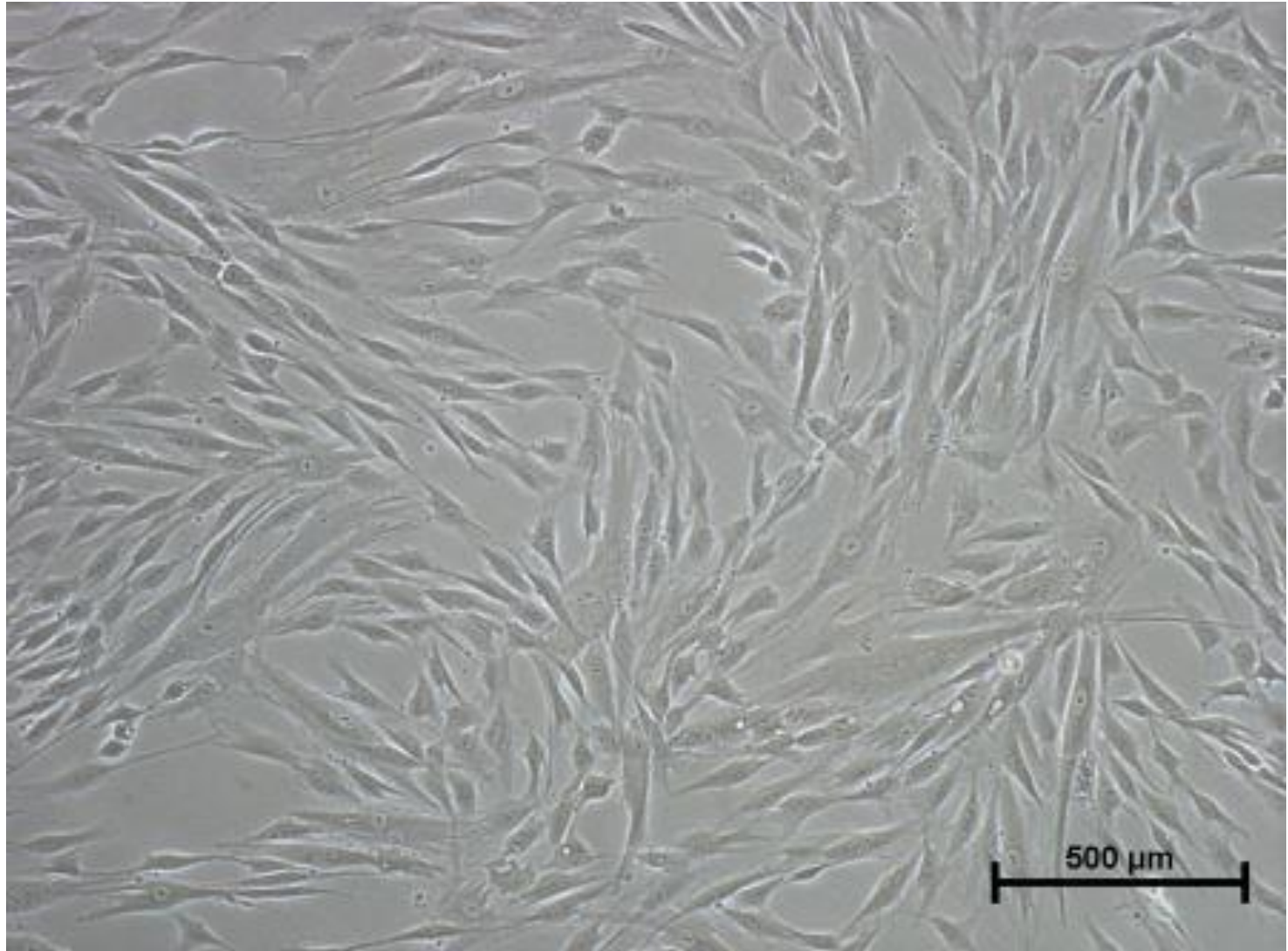
HÜCRE PASAJLAMA

- ✓ Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür petrilерinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere '***konfluent petrilер***' denir.
- ✓ Konfluent petrilерin 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. Tüpe 2-3 ml daha medyum ilave edilir.
- ✓ Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır.
- ✓ Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılır ve sayılırlar.
- ✓ Petrilere ekimler yapılır.

<https://www.youtube.com/watch?v=W4HuxXSq8Vw>

<https://www.youtube.com/watch?v=l-yJccyZUWw>

Prof. Dr. Eser ELÇİN



✓hMSC-Bone Marrow 4 days

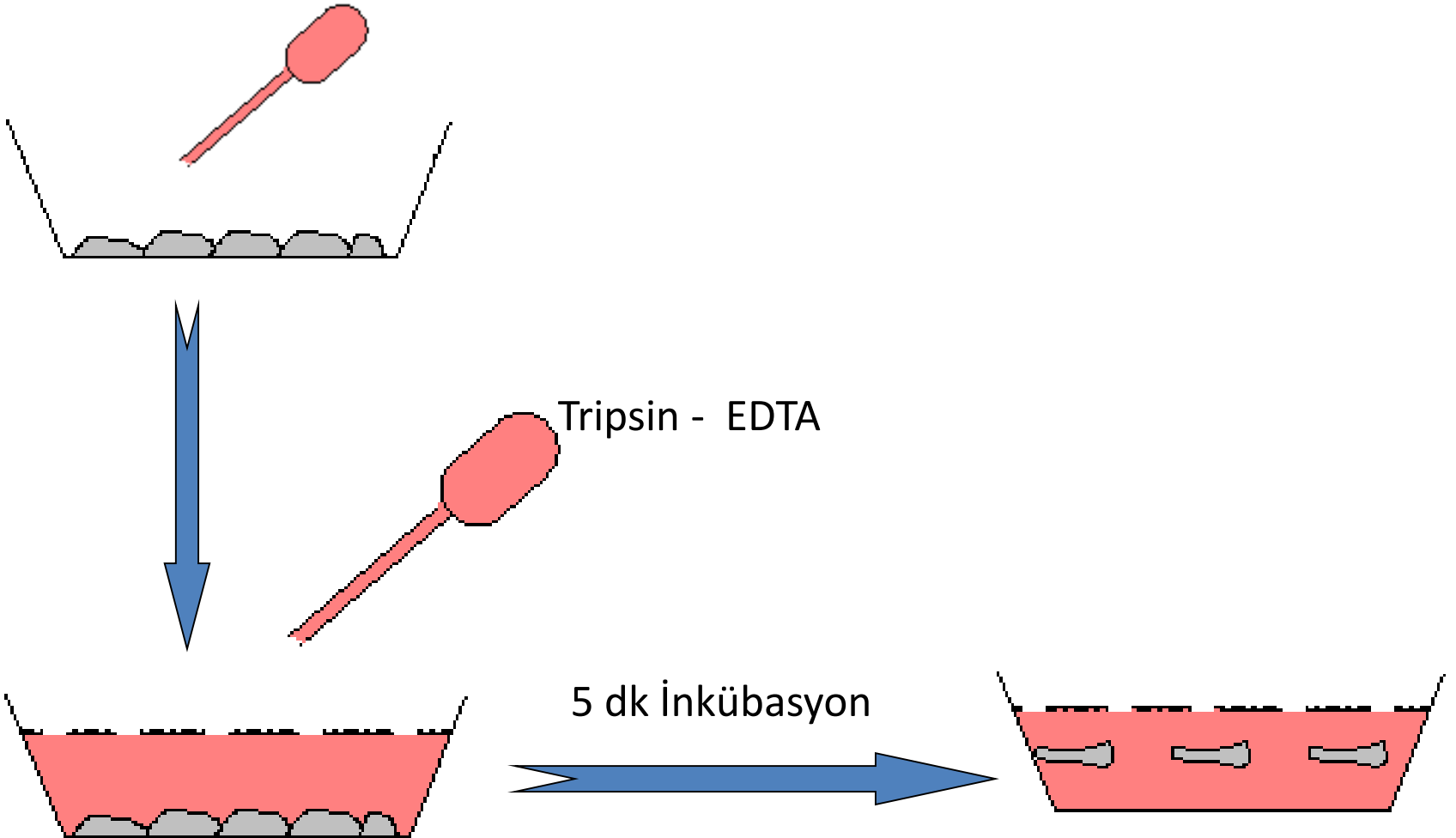
TRİPSİNİZASYON

- ✓ Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, bir serin proteaz tipi enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkar.
- ✓ Tripsin kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar şunlardır:
 - ❑ -20 °C'de saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşer, bu yüzden oligotlanarak saklanması en uygundur.
 - ❑ Serum tripsin inhibitörlerini içerir, hücrelere tripsin uygulanmadan önce mutlaka bir kere Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.

- ❑ Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanır.
- ❑ Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konduklarında daha çabuk yüzeylerden ayrılırlar, oda sıcaklığındaysa daha yavaş ayrılırlar.
- ❑ Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlar.

- ❑ Hücrelerin yüzeylerden ayrılma hızı değişebilir. Besiyerindeki serum oranı, hücre tipi, petrideki hücre yoğunluğu, tripsinin aktivitesi ve son pasaj üzerinden geçen zamana göre hücreler farklı zamanlarda kalkarlar.
- ❑ Farklı şişelerdeki tripsinler birbirlerine her zaman eş değer olmayabilir.
- ❑ Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FCS'li besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar.

Tripsinizasyon



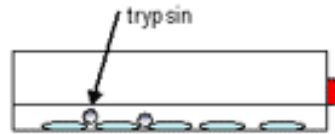
Copyright Cell Protocols 2006



After subculture, cells are sparsely attached to the cell culture flask/plate.



After a few hours-days (depending on the cell line), cells grow into the gaps of the plate, and reach confluency. At this stage, they need to be split.



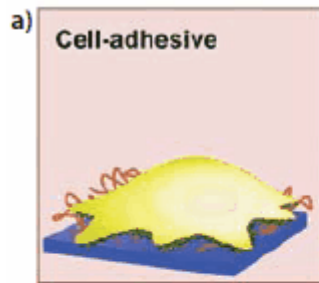
Addition of trypsin to the plate after washing away the serum digests away the protein-cell contacts allowing the cells to break away from their contacts.



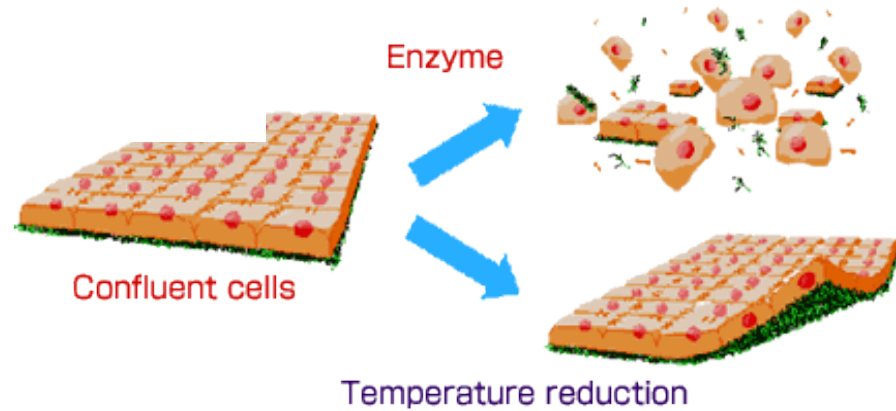
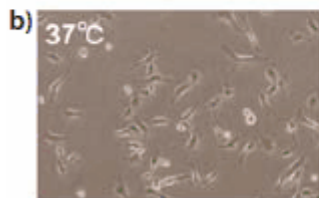
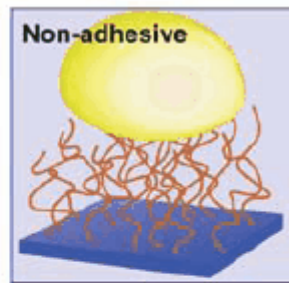
After trypsinization, most of the cells are removed from contact with the plate, and are floating.



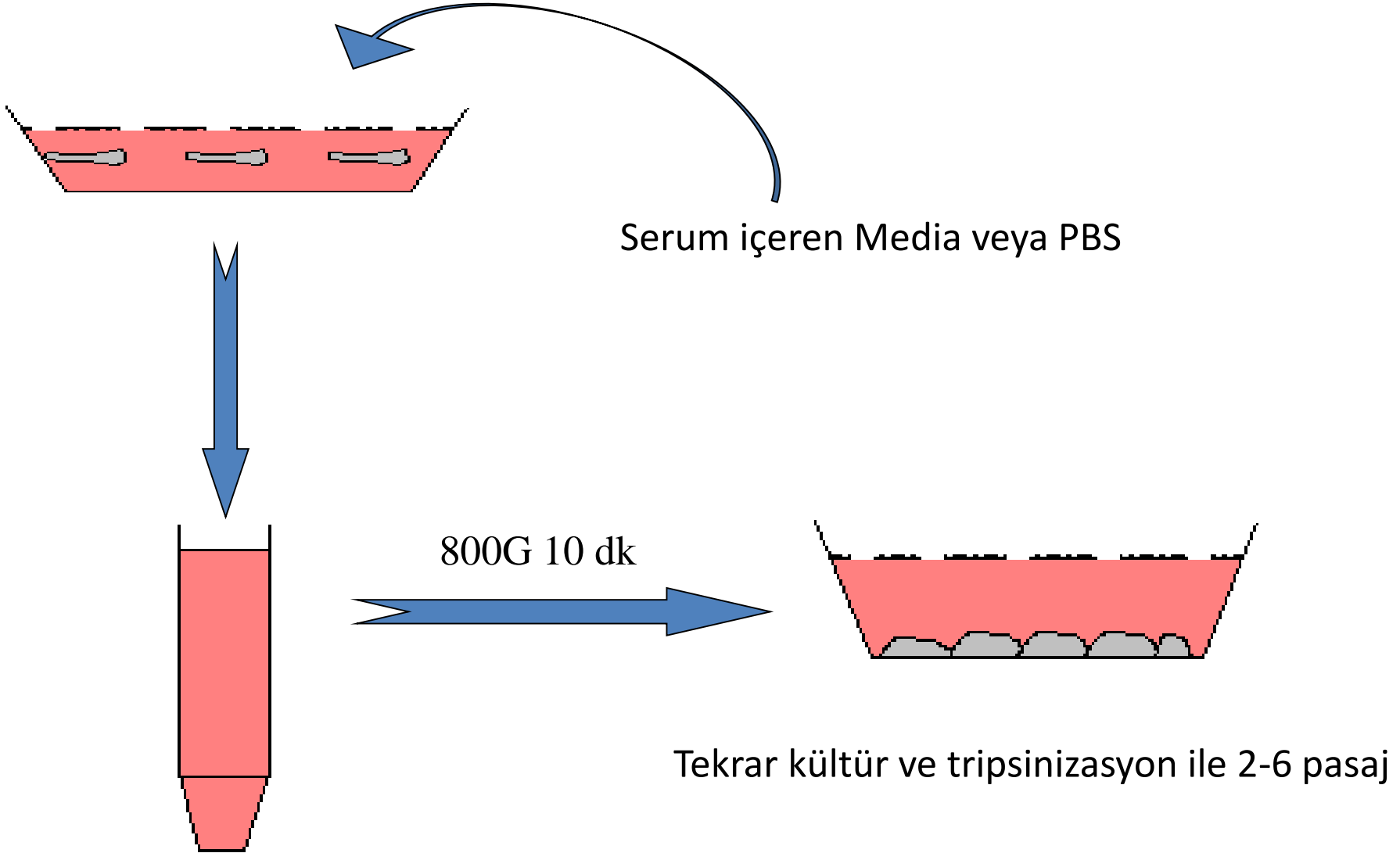
After subculture, most of the cells are removed and either discarded, or added to other flasks. Fresh Fetal Bovine Serum (FBS) and media is added.



Temp. <math>< 32\text{ }^\circ\text{C}</math>

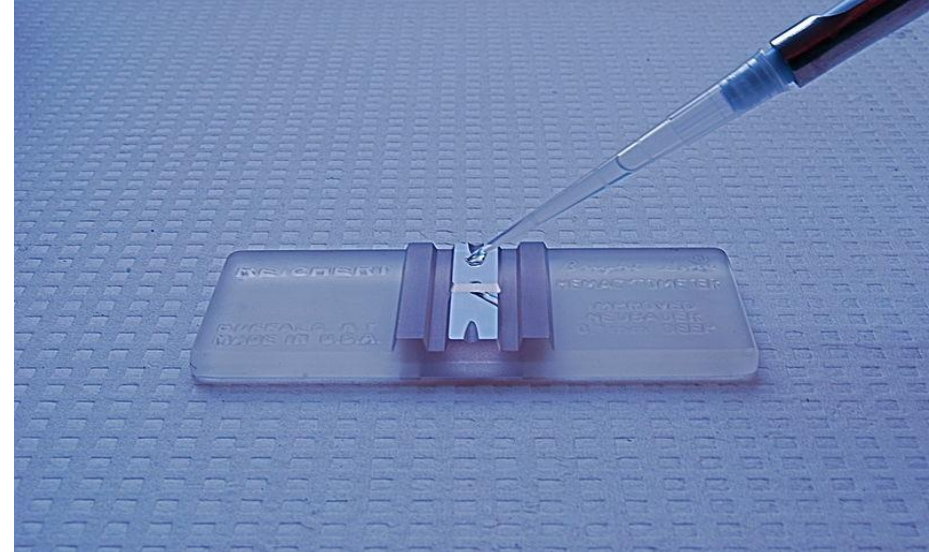


Tripsin blokajı ve yıkama

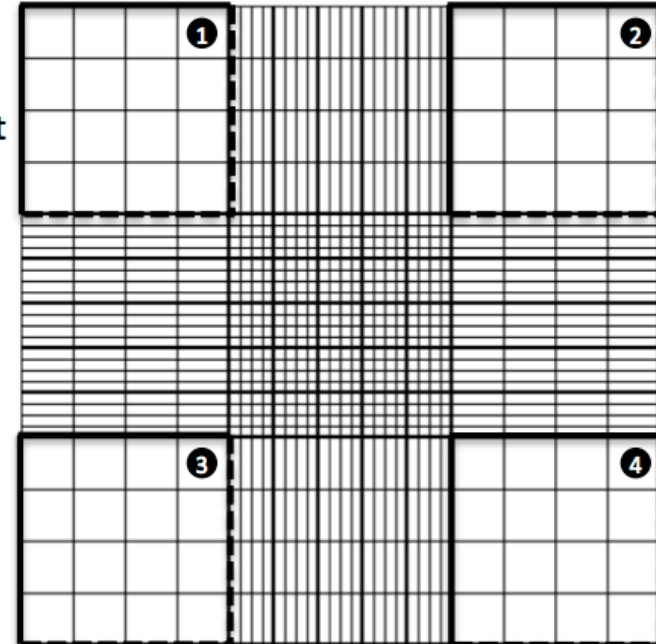


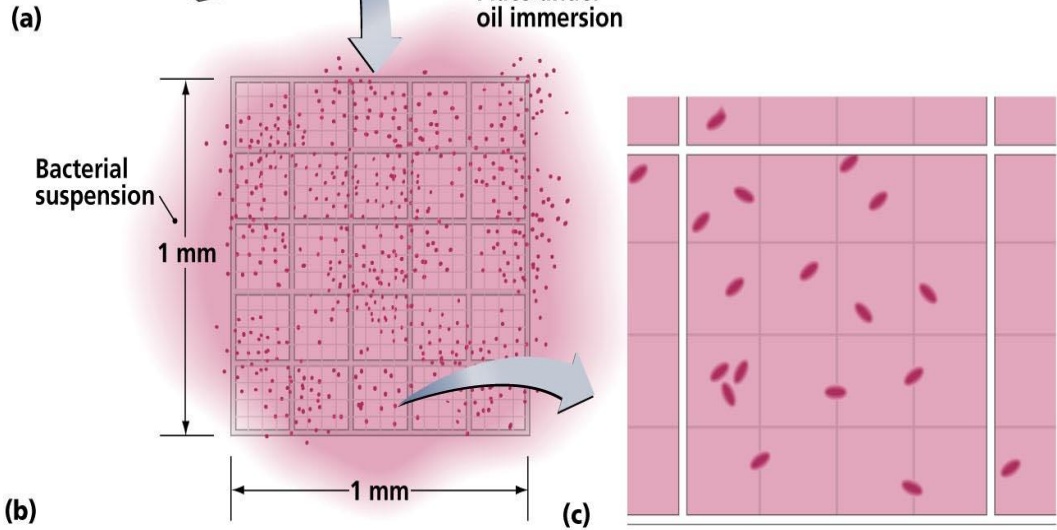
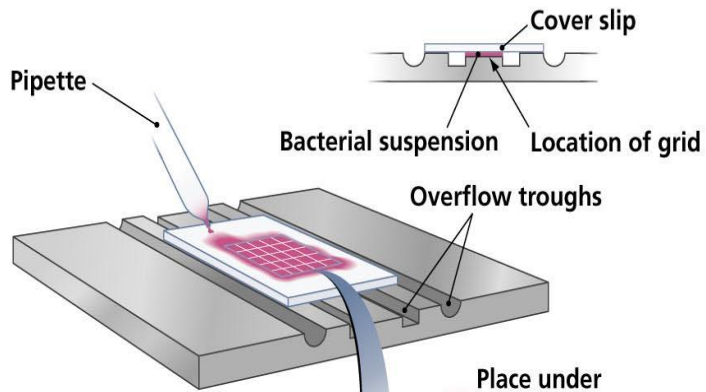
HÜCRE SAYIMI

- Hücre sayılarının hesaplanması 1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 μ l alınarak endorf tüpe konur ve üzerine 90 μ l Tripan Blue boyası konarak karıştırılır. Bu karışım Toma lamına konur, toma lamından 5 bölme sayılır, bulunan sayı sulandırma miktarı x50.000 sayısı ile çarpılır. Sonuç olarak 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğu bulunur.

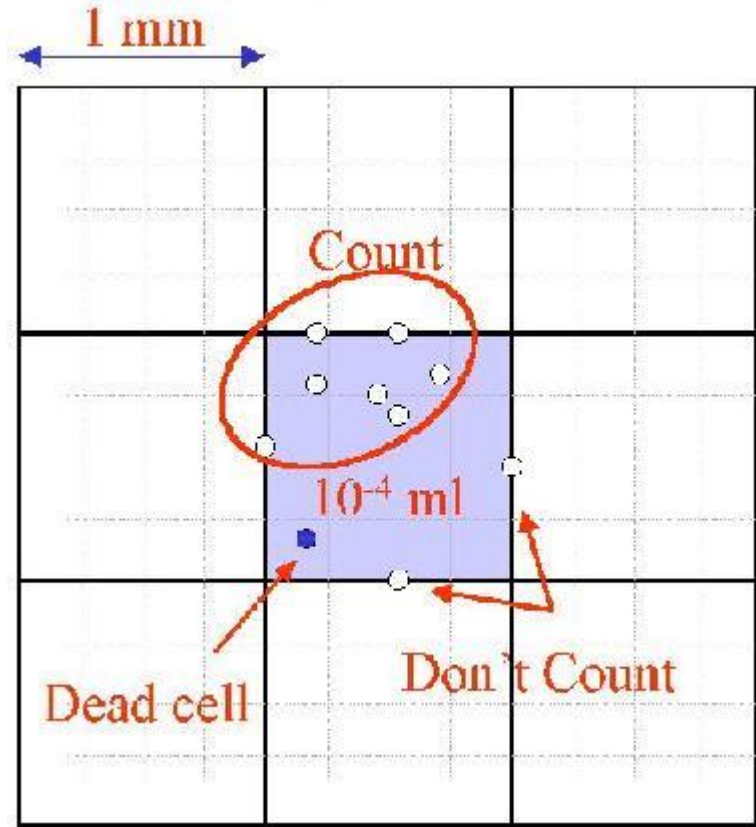


— count
- - - don't count





Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



- <https://www.youtube.com/watch?v=pP0xERLUhyc>