

# **PRİMER HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALI KURSU**

## **TÜRKHAYGEN-1 PROJESİ**

**23-24 Ocak 2008  
(TUBITAK-MAM-GMBE)**

**KURS ORGANİZASYONU  
Doç.Dr.Sezen ARAT  
Arzu TAŞ  
Gaye ÇETİNKAYA**

## **PROGRAM**

### **1. Gün 23 OCAK 2008**

**Stok Medyum ve Kullanıma Hazır Medyumun Hazırlanması**

**Primer Hücre Kültürü Ekimi**

**Primer Hücre Kültürünün Kaldırılması**

**Primer Hücre Kültüründe Elde Edilen Hücrelerin Sayımı**

**Hücrelerin Ekimi**

### **2. Gün 24 OCAK 2008**

**Hücre Açma**

**Hücre Pasajı**

**Hücre Dondurulması**

## HÜCRE KÜLTÜRÜ BESİYERİ VE SOLUSYONLAR

Hücre kültürü besiyerleri laboratuvar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan mikroçevreyi sağlayan besleyici solusyonlardır. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla hücrelerin gelişimini desteklerler. Laboratuvar ortamında hücrelerin çoğaltılabilmesi için uygun pH sıcaklık ve nemin sağlanması çok önemlidir. Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli ozmolarite ve pH'ı da sağlarlar.

Besiyeri ihtiyacı hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağı organizmanın türüne göre farklılık gösterir. Hücreler farklı besiyerlerinde farklı davranabilirler. Bu yüzden çalışmanın amacına göre hücrenin besiyeri ihtiyaçlarının belirlenmesi gerekir.

Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için aminoasitler, karbonhidratlar, lipidler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin ortamda bulunması şarttır. Standart bir besiyerinde yukarıdaki bileşenlerin sağlanması için iki temel solusyon uygulanır:

### 1) Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM)

Hücre kültürlerinde olması gereken temel aminoasit kombinasyonu ilk defa Eagle tarafından 1955'de tanımlanmıştır. Kendi ismini taşıyan Minimum Eagle's Medium (MEM) isimli besiyeri bazı modifikasyonlarla bugüne kadar gelmiştir. Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solusyonu bugün somatik hücre kültürlerinde en sık kullanılan besiyeri bileşenidir. DMEM hücrelerin beslenebilmeleri için gerekli glukozu, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptir. Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir.

### 2) Fetal Bovine Serum

Serum hücrelerin tutunabilmeleri ve çoğalmaları için kullanılan ve içeriği tam olarak tanımlanmamış zengin bir protein çözeltilisidir. Bu protein çözeltilisinin içinde hormonlar, enzimler, hücrenin büyümesi ve çoğalmasını sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan hücrelerarası matris proteinleri bulunur. Hücre çeşidine ve uygulamalara göre besiyerindeki serum oranı değişebilir. Standart bir somatik hücre kültüründe serum oranı %10 'dur.

Serum üretimi pahalı ve zahmetli bir süreçtir. Sığır embriyolarının kanlarının toplanmasıyla hazırlanan serumların üretiminde bir standart yoktur. Farklı hayvanlardan elde edilen serumlar birbirlerinden farklılık gösterirler. Bu da deneylerin sonuçlarını etkilemektedir. Bu dezavantajlarından dolayı bazı laboratuvarlar serumsuz besiyerlerini kullanmaktadırlar. Serum kullanılmayan bir besiyerinin çeşitli büyüme ve tutunma faktörleriyle desteklenmesi gerekir, bu da çalışmaya göre serumdan daha pahalı olabilir.

## **Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS)**

Hücre içi ve dışındaki ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solusyonudur. İçeriğindeki inorganik tuzlar ve su, hücre metabolizmasını destekler. pHı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar.

## **Tripsin**

Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan temel enzimdir. Tripsin, bir serin proteaz tipi enzimdir, lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri yıkar. Laboratuvarımızda %0,25 EDTA'lı tripsin solusyonu kullanılmaktadır.

Tripsin kullanımında dikkat edilmesi gereken bazı noktalar şunlardır:

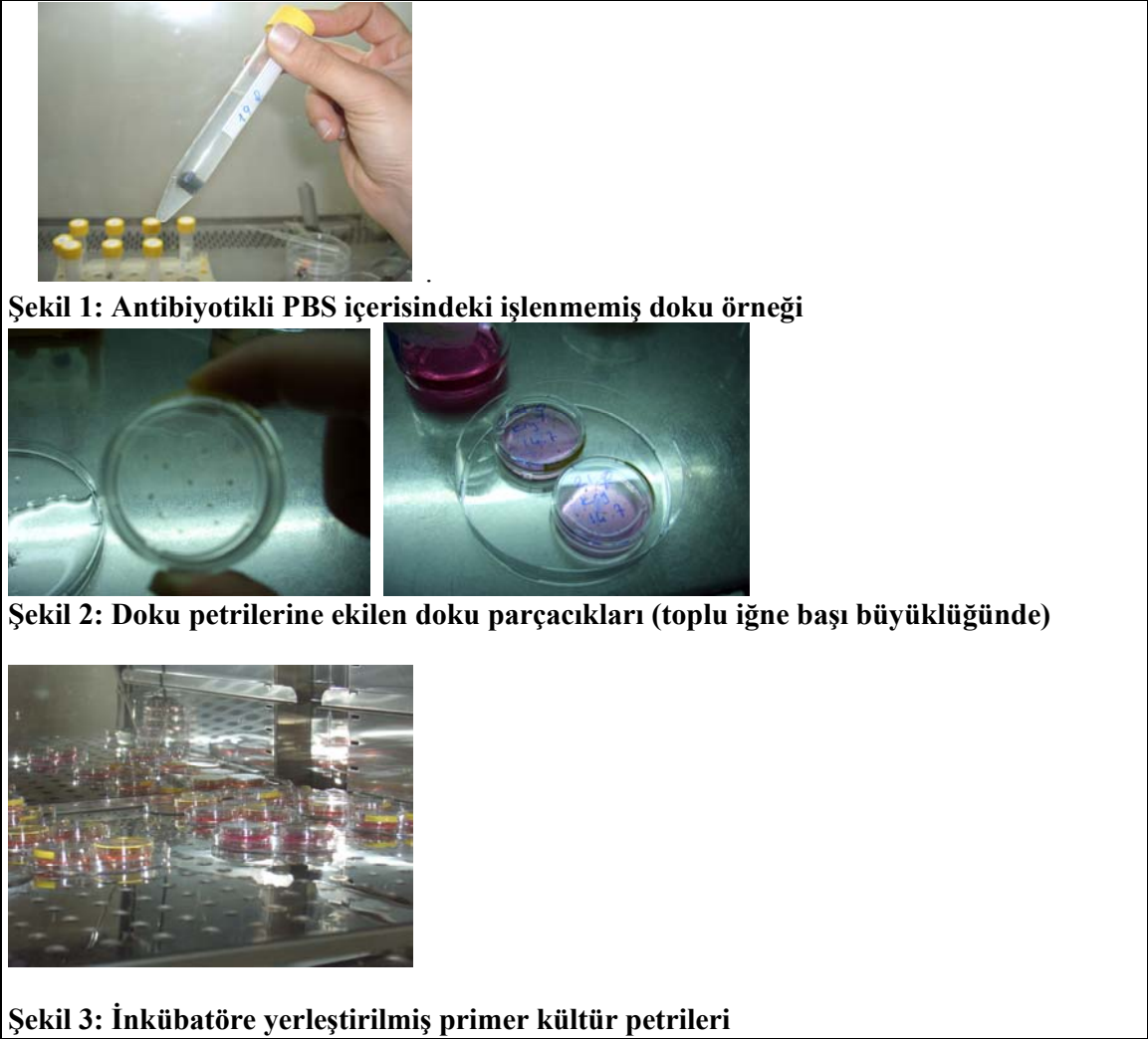
- 1) -20 °C'de saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşer, bu yüzden oligotlanarak saklanması en uygundur.
- 2) Serum tripsin inhibitörlerini içerir, hücrelere tripsin uygulanmadan önce mutlaka bir kere Ca ve Mg içermeyen PBS ile yıkanmalı ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.
- 3) Tripsin hücrelerin yüzeyini örtecek kadar uygulanır. Laboratuvarımızda 100 mm'lik petripler için 2 ml; 60 mm için 1ml; 35 mm için 0,5 ml tripsin uygulanır.
- 4) Tripsin sıcaklık arttıkça daha etkili çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konduklarında daha çabuk yüzeylerden ayrılırlar, oda sıcaklığında ise daha yavaş ayrılırlar.
- 5) Hücreler yüzeyden ayrılır ayrılmaz tripsinin inhibe edilmesi önemlidir. Tripsin hücreleri yüzeyden ayırdıktan sonra hücre membranlarına zarar vermeye başlar.
- 6) 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.
- 7) Farklı şişelerdeki tripsinler birbirlerine her zaman eş değer olmayabilir.
- 8) Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar %10 FCS'li besiyeri uygulanmalıdır. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar.

## PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİ

Doğrudan dokudan elde edilen hücre kültürlerine primer hücre kültürleri denir. Primer kültürler elde edildiklerinde dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, hücre hatları gibi tek tip hücreler değildir.

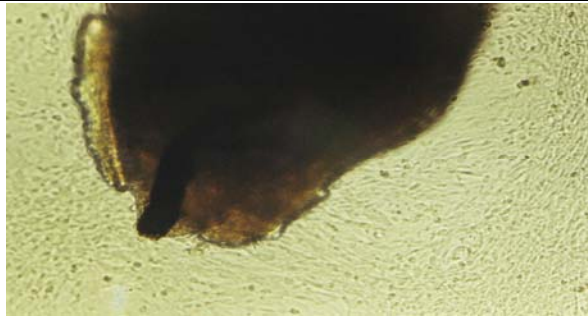
Primer hücre kültürleri küçük doku parçalarının petri yüzeylerine ekilmesiyle eksplant kültürler halinde ya da enzimatik uygulanmasıyla tek hücre süspansiyonu halinde yapılabilir. Laboratuvarımızda çoğunlukla kulak dokusundan fibroblast ve kırıldak primer kültürleri yapılmaktadır.

Primer kültürler kontaminasyon riski olan kültürlerdir, bu yüzden manipulasyonlarda steriliteye özen gösterilmelidir. Kullanılan cerrahi malzemeler otoklavlanmış olmalıdır. Tüm manipulasyonlar laminar kabin içinde yapılmalıdır.

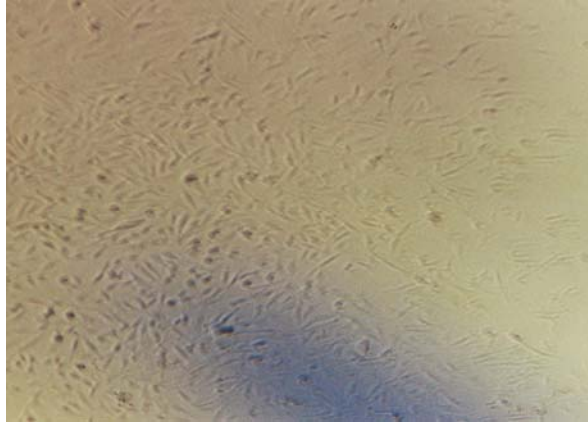


## Primer mezansimal (kıkırdak, fibroblast) hücre kültürü

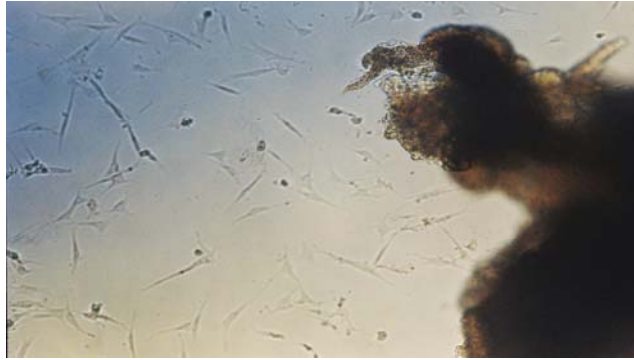
- 1) Kulak %70 alkol ile temizlenmeli ve alkol ile iyice temizlenmiş kulak pensi ile doku alınmalıdır. Hayvandan alınan dokular, + 4 derecede %5 antibiyotik içeren PBS solüsyonunda işleneceği laboratuara gelene kadar saklanır. Dokuların alınması sırasında steriliteye özen gösterilmelidir. Bu şekilde muhafaza edilen doku örnekleri 3-4 gün canlılığını muhafaza edebilir.
- 2) Laboratuara ulaşan doku örnekleri laminar kabin içinde %5 antibiyotikli PBS'den %2 antibiyotikli PBS içerisine aktarılırlar. Kulak doku parçalarının üzerindeki kıllı deri bisturi ucu yardımı ile temizlenir, kıkırdak ve bağ dokusu temiz bir petriye aktarılır ve kurumaması için üzerine az miktarda PBS damlatılır.
- 3) Steril bisturi ve pensler ile dokular iğne başı kadar küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar 35 mm'lik hücre kültür petrilere aktarılır. Dokuların kültür petrisine yapışması için bir süre (2-3 dakika) beklenir.
- 4) Hücre kültür medyumu petrinin kenarından yavaş bir şekilde dokuların üzerini kaplayacak şekilde uygulanır.
- 5) Ekim yapılan kültür petrilere inkübatöre yavaşca kaldırılır. Petriyi sarsmamaya özen gösterilmelidir aksi takdirde ekilen dokuların yerlerinden kalkma olasılığı vardır.
- 6) Petrilere her gün dışarıdan kontrol edilir. Eğer petrilere kontaminasyon tespit edilirse, kontamine petri % 70 alkolle kaplanır ve tıbbi atık olarak bertaraf edilir. **(Kontaminasyon: medyum renginin sarıya dönmesi, bulanıklaşması, tortu oluşması)**
- 7) Ekimi takiben 7 gün boyunca petrilere yerlerinden oynatılmadan kültüre edilmelidirler. 7. günde petrilere invert mikroskop altında kontrol edilir ve hücre üremesi olanlar tespit edilir. İlk olarak primer kültür petrilere medyumları 7. günde tazelenir ve 2 gün ara ile medyum değişimleri tekrarlanmalıdır. Hücrelerin petriyi kaplamasının ardından; doku parçaları pastör pipeti ile toplanır ve petrilere tripsin uygulanır ve hücreler pasajlanır. Eğer hücreler hemen kullanılmayacaksa dondurma işlemi gerçekleştirilir.



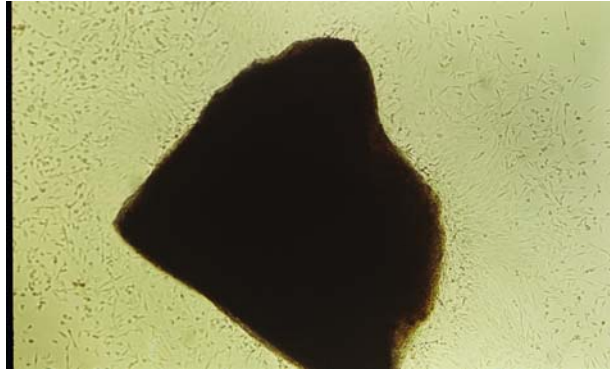
**Şekil4: Keçiye ait primer kültür. Keçiye ait kıkırdak dokusu ve çevreye yayılan hücreler**



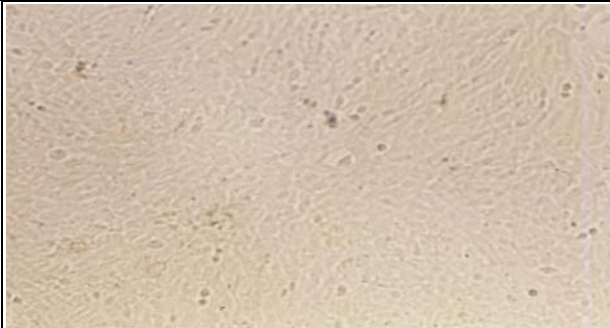
**Şekil5: Keçi primer kültürdeki elde edilen hücreler**



**Şekil6: Sığra ait primer kültür. Kültürün 7.günü**



**Şekil 7: Koyuna ait primer kültür**



**Şekil8: Primer kültürdeki elde edilen konfluent hücreler**

## HÜCRE PASAJLAMASI

- 1) Hücreler pasajlanabilmeleri için hücre kültür petrilерinin yüzeyini tamamen kaplamış olmalıdır. Böyle petrilere 'konfluent petrilер' denir.
- 2) Konfluent petrilерin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırılır.
- 3) Hücreler serumdan arındırılmak için PBS ile yıkanır,
- 4) PBS aspire edilerek uzaklaştırılır. Hücreler inkübatörde tripsinle 5 dakika inkübe edilir.  
100 mm petri için 2 ml tripsin  
6 mm petri için 1 ml tripsin  
35 mm petri için 0,5 ml tripsin uygulanır.

\*\*\*Farklı hücre tiplerinin tripsine duyarlılığı farklıdır. Bu yüzden tripsin uygulanan hücrelerden bazıları 5 dakikadan daha az sürede petri yüzeyinden ayrılabilir. Mikroskopta aralıklarla kontrol edilmelidir.

- 5) Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besiyeriyle inhibe edilir.

\*\*\*100 mm petri için 2 ml tripsin 4 ml besiyeri  
6 mm petri için 1 ml tripsin 2 ml besiyeri  
35 mm petri için 0,5 ml tripsin 1ml besiyeri uygulanır.

- 6) Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilir ve bir falkon tüpe aktarılır. Tüpe 2-3 ml daha medyum ilave edilir.
- 7) Hücre süspansiyonu santrifüjlenir (1000-1500 rpm 5 dakika), süpernatant uzaklaştırılır.
- 8) Hücreler 1 ml besiyerinde sulandırılır ve sayılırlar.
- 9) Petrilere ekimler yapılır.

### Kullanılan çözeltiler

- 1) **Hücre Kültür Medyum:** DMEM/F12 %10 FBS ve %1 Antibiyotik  
(250 ml için; 225 ml DMEM/F12, 25 ml FCS ve 250 µl antibiyotik)
- 2) **dPBS:** Ticari solüsyon
- 3) **Tripsin /EDTA % 0,25 :** Ticari Solüsyon

### Hücre sayılarının hesaplanması

1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konur ve üzerine 90 µl Tripkan Blue boyası konularak 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. Ekim yapılacak sayı belirlenip hücrelerin petriye ekimleri yapılır.

Genelde 60 mm'lik konfluent bir kültür kabı 2 tane 100 mm'lik kültür medyumlu kültür kabına geçirilebilir. 100 mm hücre kabı 1/5 oranında 100 mm'lik başka bir kaba geçirilebilir. 60 mm hücre kabı 1/5 oranında 60 mm'lik başka bir kaba geçirilebilir.

100 mm'lik kültür petrisine  $5 \times 10^6$

60 mm'lik kültür petrisine  $2 \times 10^6$

35 mm'lik kültür petrisine  $1 \times 10^6$

24 kuyuluk kültür kabının her kuyusuna 125 bin hücre transfer edilmelidir.

Bunun için hücre kültür kabı sayılır ve 500.000 hücre/ml olacak şekilde dilue edilir.

100 mm'lik kültür petrisine 10 ml hücre süspansiyonu

60 mm'lik kültür petrisine 4 ml hücre süspansiyonu + 1 ml medyum

35 mm'lik kültür petrisine 2 ml hücre süspansiyonu + 1 ml medyum

24 kuyuluğun her kuyusuna: 250 µl hücre süspansiyonu + 250 µl medyum.

## HÜCRELERİN DONDURULMASI

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

## HÜCRELERİN ÇÖZÜLMESİ

- 1) -196 °C'den alınan kriyovial 37 °C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritilir
- 2) Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 6 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarılır. Hücreler DMSO içerisinde oldukları için manipulasyonlar nazik olmalıdır.
- 3) Tüp 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılır ve pelete 1 ml medyum uygulanır.
- 4) Hücreler 1 ml içinde iyice çözüldükten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklenir. 5 ml'lik hücre süspansiyonu 60 mm'lik medyumlu'lu kültür kabına aktarılır.
- 5) Ertesi gün medyum değiştirilir (2. gün). Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edilip hücreler konfluent oldukları gün tripsinlenerek pasajlanabilir.

### Kullanılan çözeltiler

**1) Hücre Kültür Medyumunu:** DMEM/F12 %10 FBS ve %1 Antibiyotik

(250 ml için; 225 ml DMEM/F12, 25 ml FCS ve 250 µl antibiyotik)

**2) dPBS:** Ticari solüsyon

**3) Tripsin /EDTA % 0,25 :** Ticari Solüsyon

**4) Dondurma Medyumunu :** % 80 FCS ve %20 DMSO

## **KULLANILAN MALZEMELER**

### **Kimyasallar:**

1. DMEM/F12 (SİGMA D0547 1 LX10)
2. DPBS (SİGMA D5652 1 LX10)
3. %0,25 TRİPSİN-EDTA (SİGMA T4049)
4. DMSO (SİGMA D 2650 ve D 4540 )
5. ANTİBİYOTİK (SİGMA A 5955)
6. FCS (SİGMA F9665 veya BİOLOGİCAL INDUSTRIES HEAT INACTİVATED)

### **Kültür malzemeler:**

1. DONDURMA KABI MR. FROSTY (NALGENE 5100-0001)
2. DONDURMA TÜPLERİ CYROVİALLER (NUNC 377267 1,8 ml)
3. PİPET UÇLARI ( 5 ML 160510, COSTAR 10 ML 4488, 50 ML LİK PLASTİK PİPET UCU)
4. KÜLTÜR PETRİLERİ ( TPP 35 mm-93040, TPP 60 mm-93060, TPP 100 mm)
5. CAM PASTÖR PİPETİ (ISOLAB)
6. PASTÖR PİPETLER İÇİN OTOKLAVA DAYANIKLI METAL KUTU
7. KÜLTÜR TÜPLERİ (TPP 15 ML VE 50 ML-90050)