HÜCRE KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN TEMEL BESİYERİ VE SOLÜSYONLAR

- ✓ Hücre kültürü besiyerleri, laboratuar ortamında hücrelerin normal metabolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli olan **mikroçevreyi** sağlayan besleyici solüsyonlardır.
- ✓ Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki **aminoasit, karbonhidrat, vitamin ve iyonlarla** hücrelerin gelişimini desteklerler.
- ✓ Hücre kültürü besiyerleri içeriklerindeki iyonlarla gerekli **ozmolarite ve pH'ı** da sağlarlar.
- ✓ Besiyeri ihtiyacı, **hücrelerin tipine, adaptasyon kabiliyetine ve hücre kaynağının 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, lipitler, vitaminler, iyonlar ve proteinlerin** ortamda bulunması şarttır.

- Hücre kültüründe iyon bileşimi bakımından ekstrasellüler ortama en yakın olan, bunun yanı sıra hücre çoğalması için **serum** içeren çözeltiler kullanılır.

- Çözeltilerin **pH' sı 7,4** civarında olmalıdır, çoğunda pH indikatörü olarak **fenol kırmızısı** bulunur. Fenol kırmızısı, **pH 7,4' te kırmızı, 7' de turuncu, 6,5' te sarı, 7,6' da koyu pembe ve 7,8' de mor renk** vermektedir

Hücrelerin Bakımı
Besiyeri

- Fenol Kırmızısı
  - Limon sarısı < pH 6.5
  - Sarı pH 6.5
  - Turuncu pH 7.0
  - Kırmızı pH 7.4
  - Pembe pH 7.6
  - Mor pH 7.8
  - Birçok hücre pH 7.4'te optimum üreme gösterir.

- Sarımsı asidik besiyeri:
  - Fazla üremiş kültürü
  - Bakteri kontaminasyonunu
  - Fazla CO2'i işaret ediyor olabilir.

- Morumsu bazik besiyeri:
  - Üremeyen kültürü
  - Küf kontaminasyonunu
  - Az CO2'i işaret ediyor olabilir.

- Hücreler hem kültür çözeltisinin pH' sının kontrol edilebilmesi, hem de çoğalabilmesi için **bikarbonata** gereksinim gösterirler.

- Bu nedenle, içindeki karbondioksit düzeyi ayarlanabilen **inkübatörler** kullanılmalıdır.

- $H_2O + CO_2 \rightarrow H_2CO_3 \rightarrow H + HCO_3$ **pH yükselir.**

- Nötralizasyonu için ortama **$NaHCO_3$** ilave edilir.

- $NaHCO_3 \rightarrow Na + HCO_3$ **pH 7.4** olur.

- Çözeltilere tampon olarak eklenen **bikarbonat iyonu**, karbondioksit ile dengededir. Bu yolla oluşan karbondioksit çözeltiden havaya karışarak **pH'yı yükseltir.**

- Hücrelerin oluşturduğu **laktik asit ise pH'yı düşürür**.

- Bu değişimleri tamponlamak için içlerine **5- 10 mM Hepes** eklenmektedir

- Çözeltiler, inorganik iyon bileşimleri bakımından, **dengeli tuz çözeltileridir**.
- 1950'li yıllarda yayınlanmış olan Earle's Balanced Salt Solution **(EBSS),** Eagle's Minimum Essential Medium **(EMEM),** Hank's Balanced Salt Solution **(HBSS**) ve bunların zenginleştirilmiş formları; EMEM'e Dulbecco modifikasyonu (**DMEM**) , **Ham's F12**, DMEM ve F12 nin 1:1 karışımı olan **DMEM/ F12, RPMI 1640, M199** en sık kullanılan çözeltiler olmaktadır.
- Bunlara eklenen diğer moleküller, **esansiyel amino asitler, vitaminler (özellikle B vitaminleri), hormonlar (insülin, hidrokortizon) ve glikozdur** .
- Ortama % 5- 20 oranında eklenen **serum**, hücrelerin çoğalmasını sağlar.

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 **glukoza**, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun **ozmolarite ve pH'a**, fonksiyonlarını görebilmeleri için gerekli **aminoasitlere ve vitaminlere** sahiptir.
- Ancak tek başına hücre gelişimi için yeterli değildir .

Fetal Bovine Serum (FBS)

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

Fetal Bovine Serum (FBS)

- ✓ İnaktive edilmiş fetal bovine serum ticari olarak satın alınır.
- ✓ Biyolojik güvenlik kabininde 10 ml'lik steril falcon tüplere bölünerek kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanır.

RPMI-1640 BESİYERİ

- ✓ Hücre medyumu olarak kullanılacak RPMI-1640 besiyeri

  RPMI- 1640 (25mM HEPES ve L- Glutamin içeren)....88 ml

  İnaktif FBS .....10 ml

  Penisilin- streptomisin .....2 ml

- ✓ Ticari olarak satın alınan RPMI- 1640 ,besiyeri üzerine % 10 oranında inaktive edilmiş steril FBS ve % 2 oranında penisilin- streptomisin solüsyonu ilave edilir.
- ✓ Hazırlanan besiyeri miktarı 1 haftalık ihtiyaca göre ayarlanır ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklanr.

Phosphate Buffer Saline (PBS)

- ✓ Hücre içi ve dışındaki **ozmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonudur**.
- ✓ İçeriğindeki **inorganik tuzlar ve su**, hücre metabolizmasını destekler, pH'yı tamponlayarak hücreler için uygun bir ortam sağlar

Phosphate Buffer Saline (PBS) Tamponu

K_2HPO_4……..1,20 gr

Na_2HPO_4……0,22 gr

NaCl……8,5 gr

Distile su……1000 ml

Hazırlanan PBS'nin pH'ı, pH metre cihazı ile pH 7,2' ye ayarlanır. Daha sonra otoklavda 121°C'de on beş dakika steril edilir.

HÜCRE YIKAMA SOLÜSYONU

PBS……10 ml

Penisilin- streptomisin ……30 µl

- ✓ Steril falcon tüpte karıştırıldı, 0,22 mm’lik filtreden geçirilerek steril edilir.

Tripsin

- ✓ Tripsin hücre pasajlamalarında kullanılan **temel enzimdir**.
- ✓ Tripsin, bir **serin proteaz** tipi enzimdir, **lizin ve arjinin aminoasitlerinden peptidleri** yıkar.

1) **-20 ºC'de** saklanır, daha yüksek sıcaklıklarda bekleyen tripsinin aktivitesi düşer, bu yüzden aligotlanarak saklanması en uygunudur.
2) Serum **tripsin inhibitörlerini** içerir, hücrelere tripsin uygulanmadan önce mutlaka **bir kez Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanmalı** ve yüzeylerindeki serum uzaklaştırılmalıdır.
3) Tripsin **hücrelerin yüzeyini örtecek** kadar uygulanır.

4) Tripsin **sıcaklık arttıkça daha etkili** çalışır. Tripsin uygulanan hücreler inkübatöre konduklarında daha çabuk yüzeylerden ayrılırlar, oda sıcaklığındaysa 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.

8) Tripsini inhibe etmek için tripsin hacminin en az iki katı kadar **%10 FCS'li besiyeri uygulanmalıdır**. Daha sonra hücreler pipetlenerek birbirlerinden ayrılırlar

HÜCRELERİ ÇÖZME

- ✓ Dondurularak saklanan hücreler bir çalışmada kullanılmadan önce **azot tankından ya da - 80°C' lik** soğutucudan çıkarılır ve sıcaklığı **37°C' ye ayarlanmış su banyosunda hızla** çözdürülür.
- ✓ Çözdürülen hücre çözeltisi **taze besiyeri ile dilüe** edilir. Santrifüj işlemi ile dondurma aşamasında kullanılan maddeler uzaklaştırılır.
- ✓ Pellet taze besiyerinde süspanse edilerek, yine taze besiyeri içeren petrilere aktarılır.
- ✓ 37°C' de % 5 CO_2' li inkübatörde inkübasyona kaldırılır.

HÜCRELERİ ÇÖZME

- ✓ Dondurulmuş hücrelerin **devitrifikasyon ve rekristalizasyon** harabiyetlerini minimuma indirmek için **hızla** çözdürülmesi gereklidir.
- ✓ Donma sırasında şekillenen **küçük buz partikülleri, çözdürme esnasında** erir.
- ✓ Çözdürme esnasında, hücrelerin hızlı rehidrasyonu sırasında ozmotik strese bağlı olarak hasarlar meydana gelebilir.
- ✓ Bu nedenle **çözdürme hızı çok** önemlidir

HÜCRELERİ ÇÖZME

- Çözdürülecek hücreler için taze besiyeri (%10 FBS, %2 penisilin-streptomisin ilaveli RPMI-1640) oda sıcaklığında hazır bulundurulur.
- Su banyosu 37 ^{o}C'ye ayarlanır.
- Hücre -80°C soğutucudan yada sıvı nitrojen tankından çıkarılır, sıcaklığı 37 ^{o}C'ye ayarlı su banyosunda hızla çözdürülür.
- Çözdürülen hücre çözeltisinden 1 ml, 9 ml taze besiyeri içine eklenip pipetaj yapılır.
- 1000 devirde 5 dk santrifüj edilir. Süpernatan çekilip uzaklaştırılır.
- Pellet üzerine 4 ml kadar taze besiyeri eklenip süspansiyon haline gelene kadar pipetaj yapılır.
- Bu süspansiyondan 1'er ml, 9'ar ml taze besiyeri içeren hücre kültür flasklarına eklenir. Flasklar % 5 CO_2'li inkübatöre 37°C ye kaldırılır.

HÜCRELERİN BESLENMESİ

- ✓ Her hücre tipi için kullanılacak **büyüme çözeltisi** alındığı yerden ya da yazılı kaynaklardan öğrenilmelidir.
- ✓ **Büyüme çözeltilerinde**, hücre dışı ortamla izoosmotik **bir tuz karışımı**, tampon olarak **sodyum bikarbonat** ve besleyici amaçlı çeşitli **aminoasitler, vitaminler** ve pH indikatörü olarak **fenol kırmızısı** bulunur .
- ✓ Büyüme çözeltileri ya hazır olarak ya da belirli hacimde, çözelti yapılabilecek toz materyal olarak satın alınırlar. Toz materyal çözelti haline getirilip pH' sı ayarlandıktan sonra **0.22 µm filtreden** süzülerek sterilize edilir.

HÜCRELERİN BESLENMESİ

- ✓ Çoğu hücre, **pH; 7.4 civarında** optimal olarak büyüyüp çoğalmaktadır.
- ✓ Büyüme çözeltilerine **% 5-20 oranında (v/v) serum** eklenir. En sık kullanılan **serum fetal buzağı** serumudur. Bazı hücreler at serumuna hatta bazı primer hücreler elde edildikleri canlının serumuna gereksinim duyarlar.
- ✓ **Antibiyotikler** sıklıkla ortama eklenirler ancak 37°C'de stabiliteleri kısa süreli olduğundan kontaminasyona karşı koruyuculukları sınırlı olmaktadır.

HÜCRELERİN BESLENMESİ

- **En sık kullanılan standart antibiyotikler**:

- **Gentamisin** 5- 10 mg/ml stoktan 50 µm/ml olacak şekilde (37°C' deki yarı ömürleri 15 gün)
- **Penisilin** 10,000 U/ml stoktan 100 U/ml (37°C' deki yarı ömürleri 2 gün) ve
- **streptomisin** 10 mg/ml stoktan 100 µg/ml olacak şekilde (37°C' deki yarı ömürleri 4 gün).

- Büyüme çözeltileri pek çok dayanıksız madde içerdiğinden, +**4°C'de saklanmalı**, ancak hücrelere eklenmeden hemen önce **37°C'lik su banyosunda on dakika ısıtılmalıdır.**

Kültür ortamını dört faktör etkiler

- ✓ **pH' ın düşmesi: pH 7' den 6.5' e düşerse** bir çok hücrenin **büyümesi durur** ve **pH 6-6.5** arasında **ölmeye** başlarlar. Ortamın pH' sı düştüğünde indikatör olan **fenol kırmızısının** rengi **önce turuncuya sonra sarıya** döner. Bu durumda besiyeri değiştirilmelidir.

- ✓ **Hücre konsantrasyonu:** Kültürde yüksek hücre konsantrasyonu varsa besiyeri daha **çabuk tükenir**. Bu durum çoğunlukla pH değişimine neden olur.

Kültür ortamını dört faktör etkiler

- ✓ **Hücre türü:** Normal hücreler yüksek hücre yoğunluğuna ulaştıkları zaman **bölünmeyi durdururlar**.
- ✓ **G1 fazında** kalan hücreler uzun süre **canlı kalabilirler**.
- ✓ **Dönüştürülmüş, ölümsüzleştirilmiş hücreler ve bazı embriyonik hücreler** ise kültürde yüksek konsantrasyona ulaştıklarında, kültür değiştirilmez veya subkültüre edilmezse **hızla bozulurlar**.

Kültür ortamını dört faktör etkiler

- ✓ **Hücre morfolojisi:** Eğer kültürde **çekirdek çevresinde granüllerin belirmesi,** hücrelerin **yuvarlaklaşıp tabandan** ayrılması gibi olaylar başlamışsa kültürde **morfolojik bozulmalar** olmuş demektir.

- ✓ Bu belirtiler **kültürün ortam değişikliğine** ihtiyaç duyduğunu gösterir veya **kültürdeki hücreler yaşlanmış, mikrobiyolojik kontaminasyona uğramış, toksik ortamla karşı karşıya gelmiş** anlamına gelir.

- ✓ Kültürde daha ciddi sorunlarla karşılaşmamak için, kültür rutin olarak kontrol edilmelidir.

HÜCRE SAYIMI

- ✓ Hücre **hatlarının devamı, primer kültürün kararlılığı (yoğunluğu), kültür şartlarında çoğalma, deneysel** incelemelerde farklı hücre hatlarında büyük miktarlarda hücrelerin karekterizasyonu için hücre kültürünün sayılması gerekmektedir.

- ✓ Steril şartlar altında çalışılır. İnkübatörde ki yada criyoda ki kültürler kullanılarak **kısa sürede hızlı ve doğru bir şekilde** sonuca ulaşılır

- ✓ Bir kültürün büyüme oranı mikroskop altındaki görünüşlerinden tahmin edilebilmesine rağmen, **kültür şartlarının standartilizasyonu ve doğru miktarlarda deneylerin analizleri** için yeterli değildir.
- ✓ Ve tercihen her bir deney esnasından önce ve sonra **çoğalan hücrelerin sayılması** gerekmektedir.

HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİTE

- ✓ Ölçüm performansı ve tekrarlanabilirlik başarısı için ya da çalışmalarda karşılaştırma yapmak için **hücre popülasyonlarının miktarlarının belirlenmesine** ihtiyaç vardır.
- ✓ Bu nedenle hücre popülasyonlarında **hücre canlılığı ve proliferasyonlarını** belirlemek için bazı metotlar geliştirilmiştir.
- ✓ **Direkt hücre sayımında canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için genellikle hemositometre ile birlikte vital bir boya (trypan blue) kullanılır**. Bu metot kolay, çabuk ve ucuzdur ve toplam hücre süspansiyonundan sadece küçük fraksiyonlar gerektirir .

HÜCRE CANLILIĞI VE SİTOTOKSİTE

- ✓ Deneye başlanırken ya da subkültür esnasında hücrelerin sık olarak sayılmaları ve transfer edilmeden önce **belli bir konsantrasyonda (hücre/ml) dilüe edilmeleri** gerekir.
- ✓ Hücre süspansiyonunun konsantrasyonunu, mikroskop altında **hücreleri düzgün bir chamber içine yerleştirerek tayin** edebiliriz.
- ✓ **Sınırlandırılmış bir alan içindeki hücre sayısı belirlenir ve hücre konsantrasyonu, istenilen sayıya** ayarlanır.

HEMOSİTOMETRE İLE HÜCRE SAYIMI

- ✓ Hücre sayımı için en genel metot **hemositometre** kullanmaktır.
- ✓ Kalın düz sayım **odacıklı lamın üzerine lamel konması** temeline dayanmaktadır.
- ✓ Temel olarak lam üzerinde **çizgi ile kesin olarak kazınmış 1 mm kareler ve daha küçük kareler** içerir.
- ✓ Hücre süspansiyonları lam lamel arasına doldurulduğu zaman hücreler mikroskop altında gözlenebilir ve **seçili kare çizgisi içindeki hücreler sayılır.**
- ✓ Bu sayımdan **süspansiyonun mililitresindeki hücre sayısı** hesaplanabilir

HEMOSİTOMETRE İLE HÜCRE SAYIMI

- ✓ Rutin ve hızlı hücre sayımı için kullanılabilecek temel araç **hemositometredir**.
- ✓ Hücre sayımı amacıyla en çok kullanılan hemositometreler, buluş sahiplerinin adlarına atfen '**Thoma" Lamı, "Neubauer" Lamı ve "Burker" Lamı** olarak tanımlanırlar.
- ✓ Hemositometre üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış **9 büyük kareden** oluşan yivler bulunan özel mikroskop lamıdır.
- ✓ Her büyük karenin alanı 1 mm^2 dir. Lam üzerine koyulan sıvının derinliği 0.1 mm'dir. Uygun bir lamelle kapatılan ve kapiller yayılma ile içine hücre süspansiyonu konan hemositometredeki her kare 0.1 mm^3 solüsyon içerecek şekilde ayarlanmıştır **Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10^{-4} ml' dir**

TRYPAN BLUE CANLILIK TESTİ

- ✓ Trypan blue canlılık testi genellikle **hücre ayırma, dondurma veya çözme** gibi potansiyel olarak travmatik bir işlemden sonra **canlı kalan hücrelerin oranını** ölçmek için kullanılır.

- ✓ Birçok canlılık testi **membran bütünlüğünün bozularak hücrenin, normalde geçirgen olmadığı bir boyayı alması** esasına dayanır .

TRYPAN BLUE CANLILIK TESTİ

- ✓ Hücre membranının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde söz konusu boya hücre içerisine girer ve stoplazmayı boyar.
- ✓ Bu durumda mikroskobik bakımdan **canlı hücreler parlak sarı renkte, ölü hücreler ise kullanılan boyanın özelliğine göre değişen renklerde** görülür.
- ✓ Bu metodun temel prensibi, **canlı hücreler boyayı almaz iken ölü hücrelerin almasıdır**.
- ✓ Hücre süspansiyonu trypan blue ile dilüe edildiğinde **canlı hücreler küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görünürler.**
- ✓ **Ölü hücreler** ise, **büyük ve koyu mavi hale** gelirler.
- ✓ Her iki hücrenin total sayısı **mililitre basına ve canlı hücrelerin yüzdesi** olarak belirlenebilir.

HEMOSİTOMETRİ KULLANILARAK BOYA ALMAMA ESASLI HÜCRE SAYIMI VE CANLILIK ÖLÇÜMÜ YÖNTEMİ

Prensip: Çok küçük hacimdeki hücre süspansiyonunun içerdiği hücre sayısının mikroskop yardımıyla sayılmasıdır. Sayım sırasında ortama **tripan mavisi** gibi bir vital boya da eklenirse hem süspansiyondaki **hücrelerin sayısı hem de canlılık oranı** saptanabilir. Hücre süspansiyonu boya ile karıştırılır ve düşük güçlü mikroskop ile incelenir.

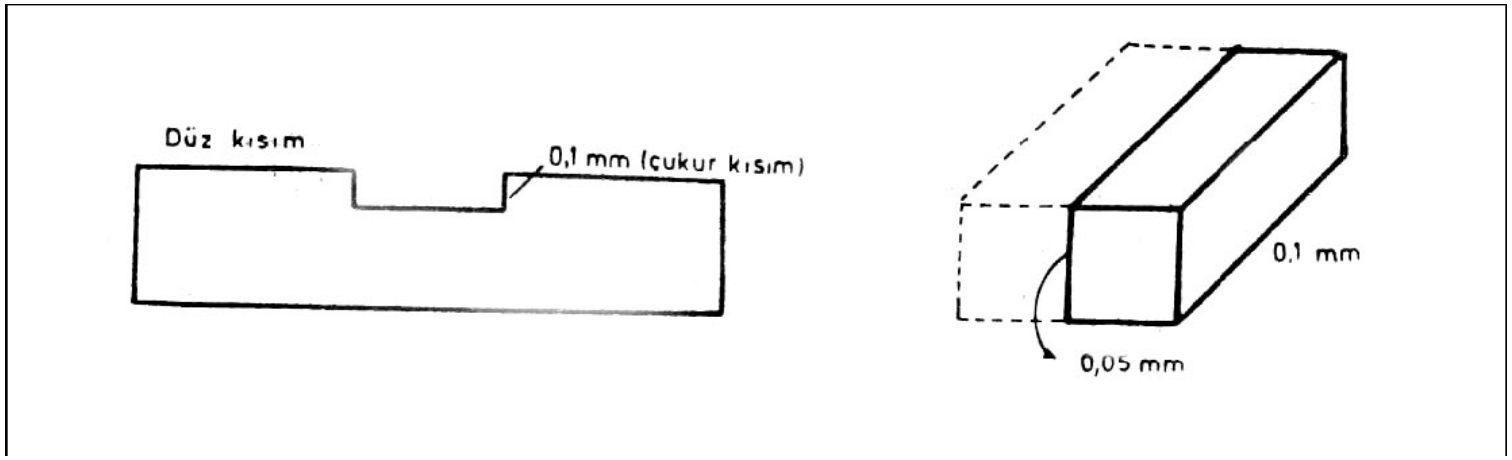
Amaç: Hazırlanan bir hücre süspansiyonunun yoğunluğunun (mililitrediki hücre sayısının) ve canlılık oranının belirlenmesidir.

TRYPAN BLUE CANLILIK KONTROLÜ

- ✓ Hücrelerin canlılığı trypan blue ile kontrol edilir.
- ✓ Lam üzerine 100 mikrolitre hücre süspansiyonu ve 100 mikrolitre ml trypan blue boyası koyularak karıştırılır.
- ✓ Işık mikroskobunda x 40 büyütmede hücreler sayılır.
- ✓ Boya almayan hücrelerin (canlı hücreler) yüzde oranı hesaplanır.

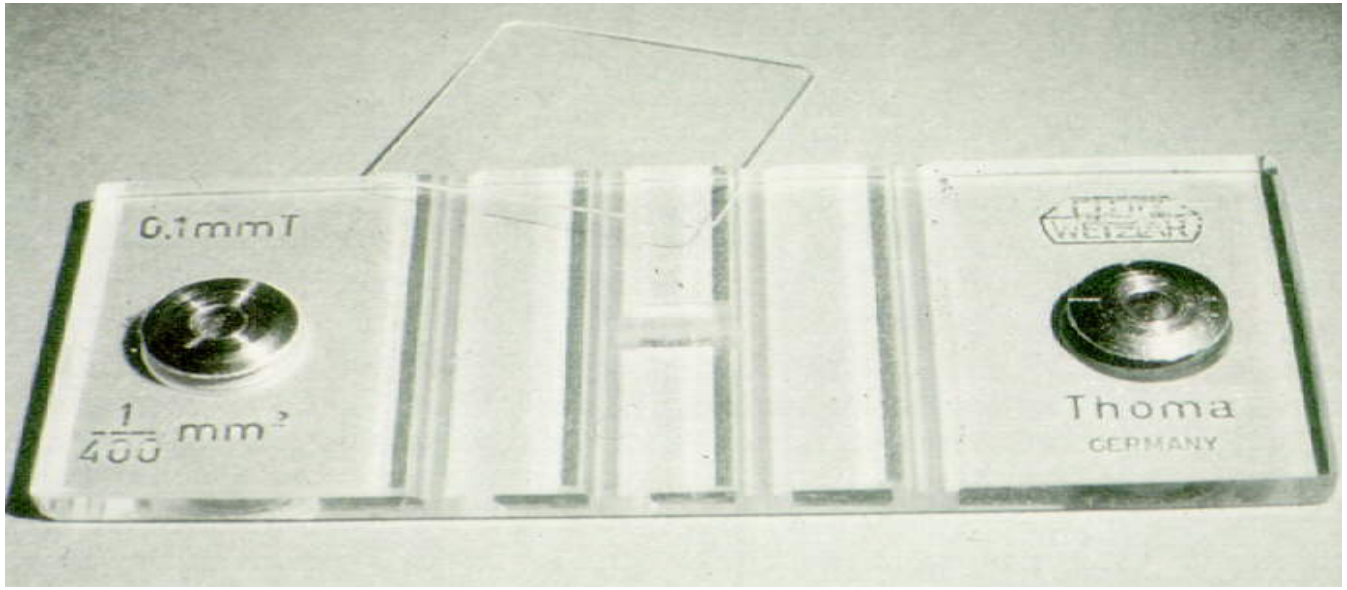
THOMA LAMI İLE HÜCRE SAYIMI

- ✓ **Thoma lamı**nın esası, 0,1 mm^3 hacimde sayım yapılmasıdır



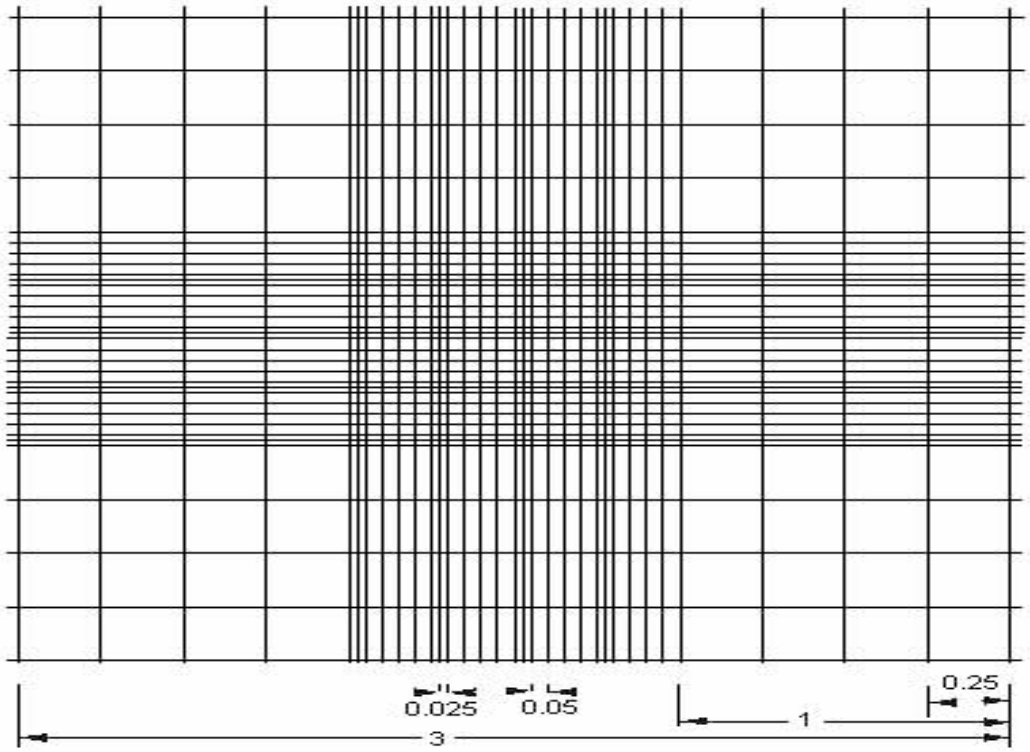
Thoma lamı yandan görünüş

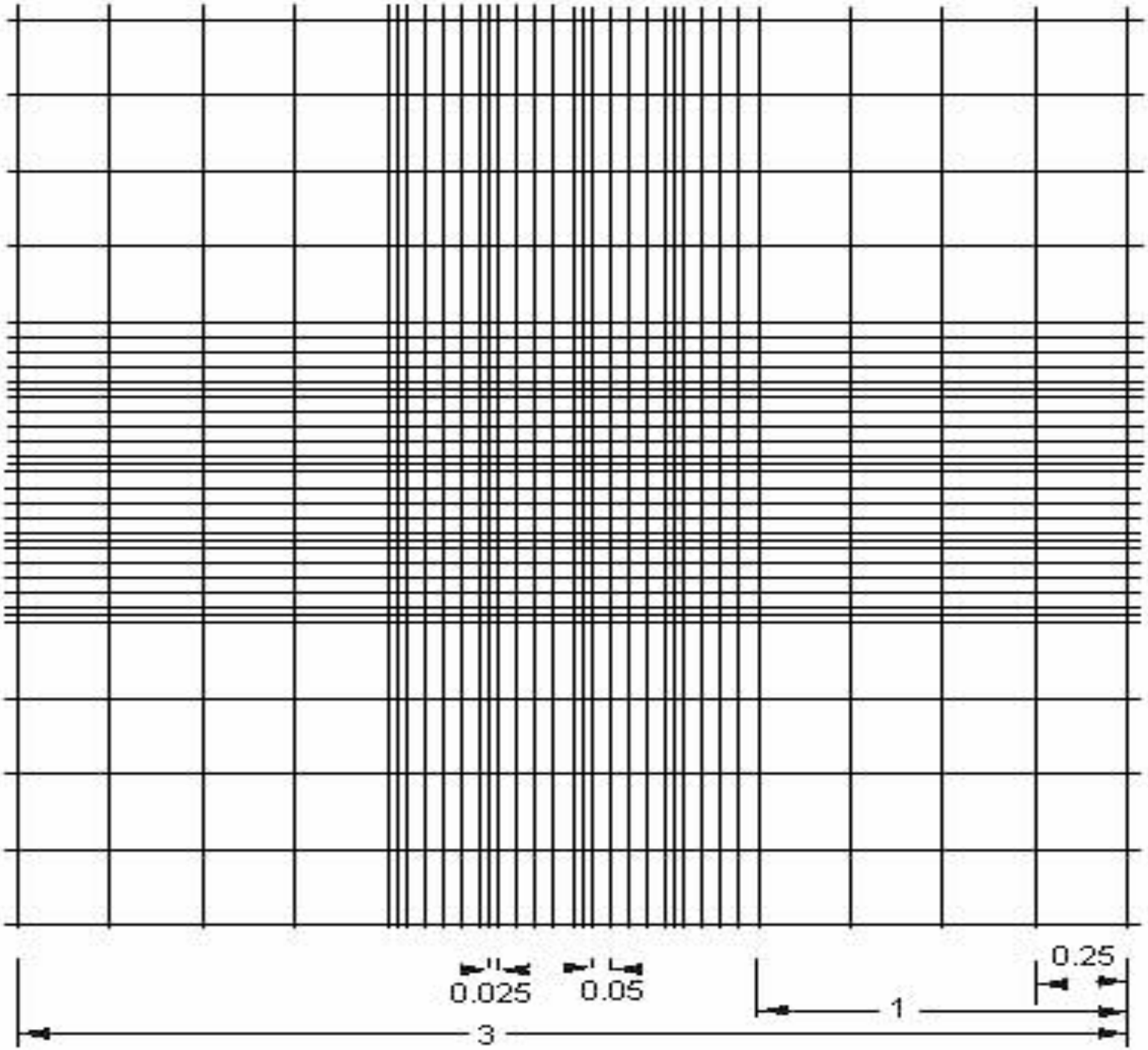
- ✓ Lamın çukur bir kısmı vardır. Kültür, bu kısım üzerine aktarılır, lamel kapatıldığında bu çukurda **0,1 mm yüksekliğinde bir sıv**ı kalır.
- ✓ Sayım yapılacak alan cam yüzeyindeki çizgilerle belirlenmiştir.
- ✓ Lamel konduktan sonra üzerine bastırılarak lamın çukuru dışında kalan düz kısmı ile lamel arasında bir sıvı katmanının kalması önlenir.
- ✓ Böylece çukur alan içinde tam olarak 0,1 mm yüksekliğinde sıvı bulunması sağlanmış olur.



Thoma lamı üstten görünüş

- ✓ Thoma lamında **1 büyük kare 16 orta boy kare, her orta boy karede 25 küçük kare olmak üzere toplam 400 küçük kare** vardır.
- ✓ Sayım bu karelerde yapılır.




0.025
0.05
0.25
1
3

- Küçük kare olarak belirtilen gerçekte bir **kare prizmadır.**
- **Derinlik boyutu**, şekilde verilen çukurun derinliğini göstermekte olup, **1/10 = 0,1 mm** dir.
- 1 küçük kare olarak belirtilen kare prizmanın hacmi = **0,05 mm x 0,05 mm x 0,1 mm = 0,00025 mm^3 = 1/4.000 mm^3'**dür.
- Bir sayım alanında 16 x 25 = 400 küçük kare olduğundan toplam sayım hacmi = 0,00025 mm^3 x 400 = **0,1 mm^3'dür**

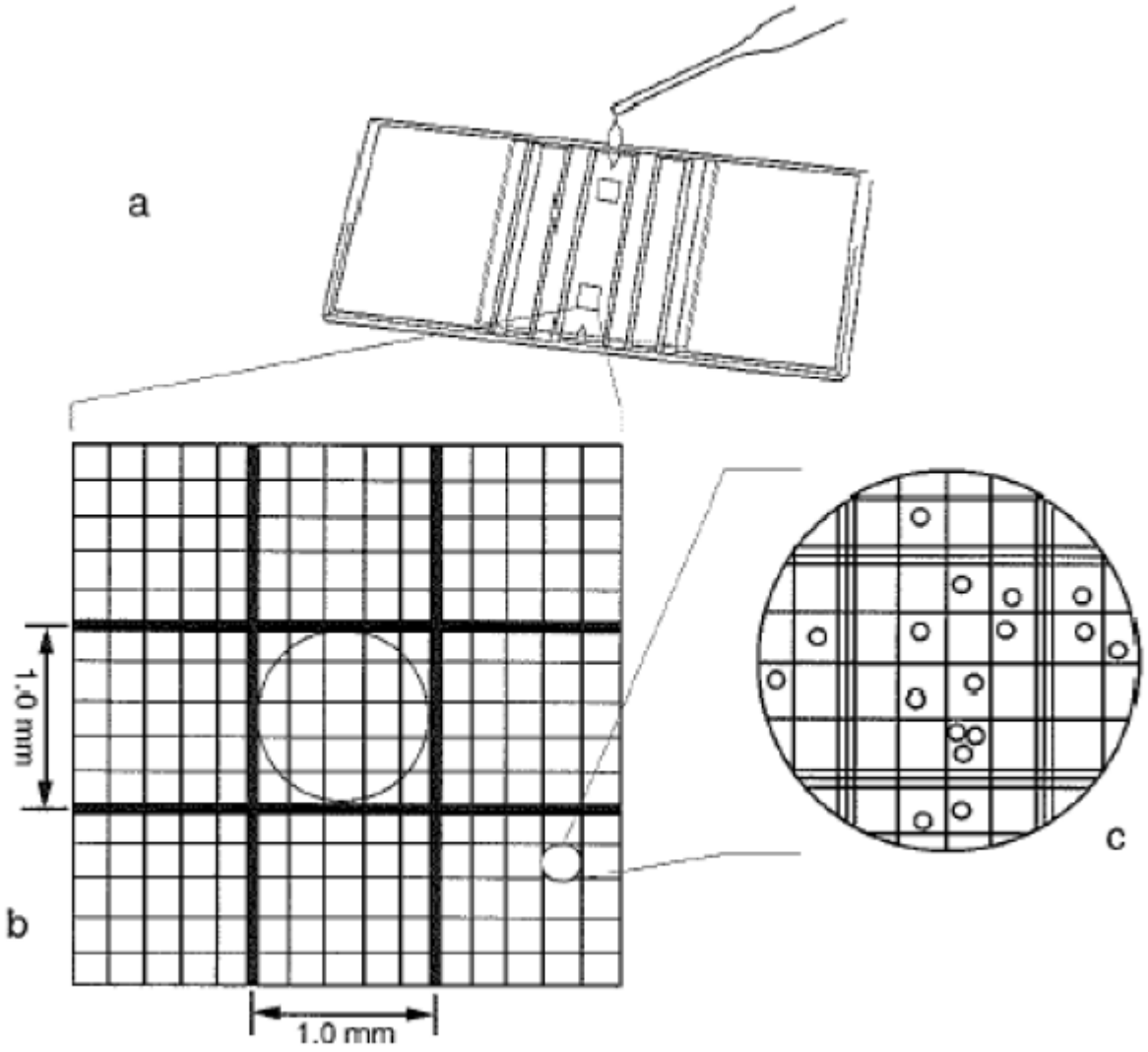
Thoma lamında sayım sonucu A x SF x16 x 10.000 formülü ile hesaplanır.

A : Bir orta boy karede sayılan hücre adedi

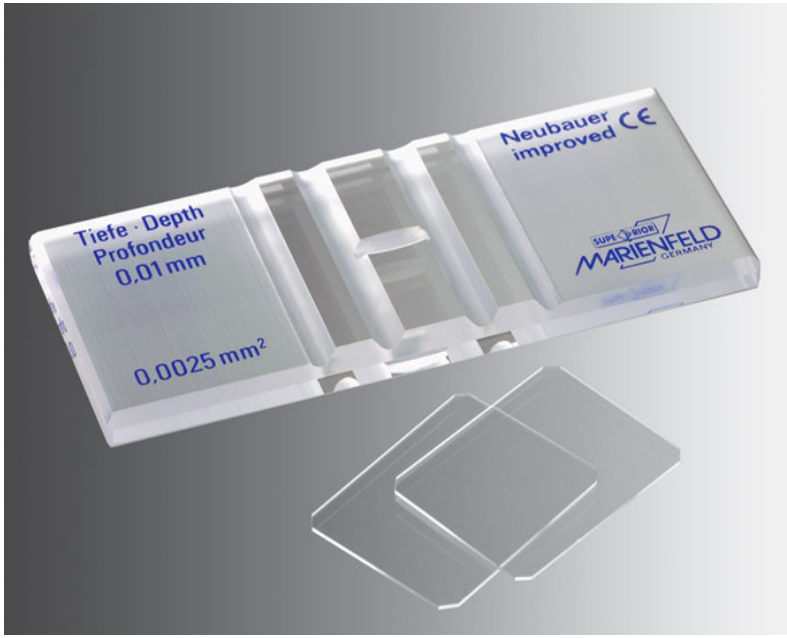
SF : Seyreltme faktörü

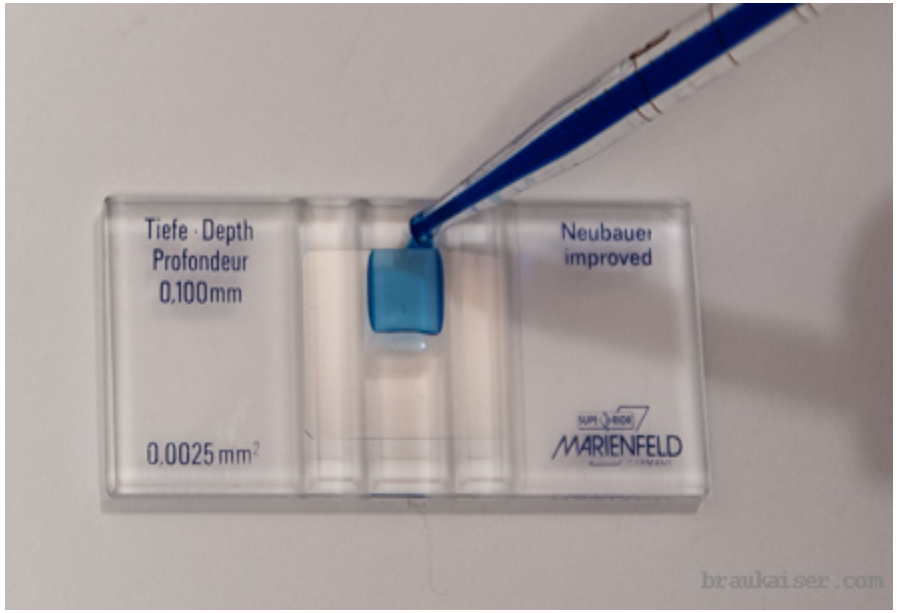
16 : 16 adet orta boy kare olduğundan tüm kare sonucuna erişmek için kullanılan çarpan

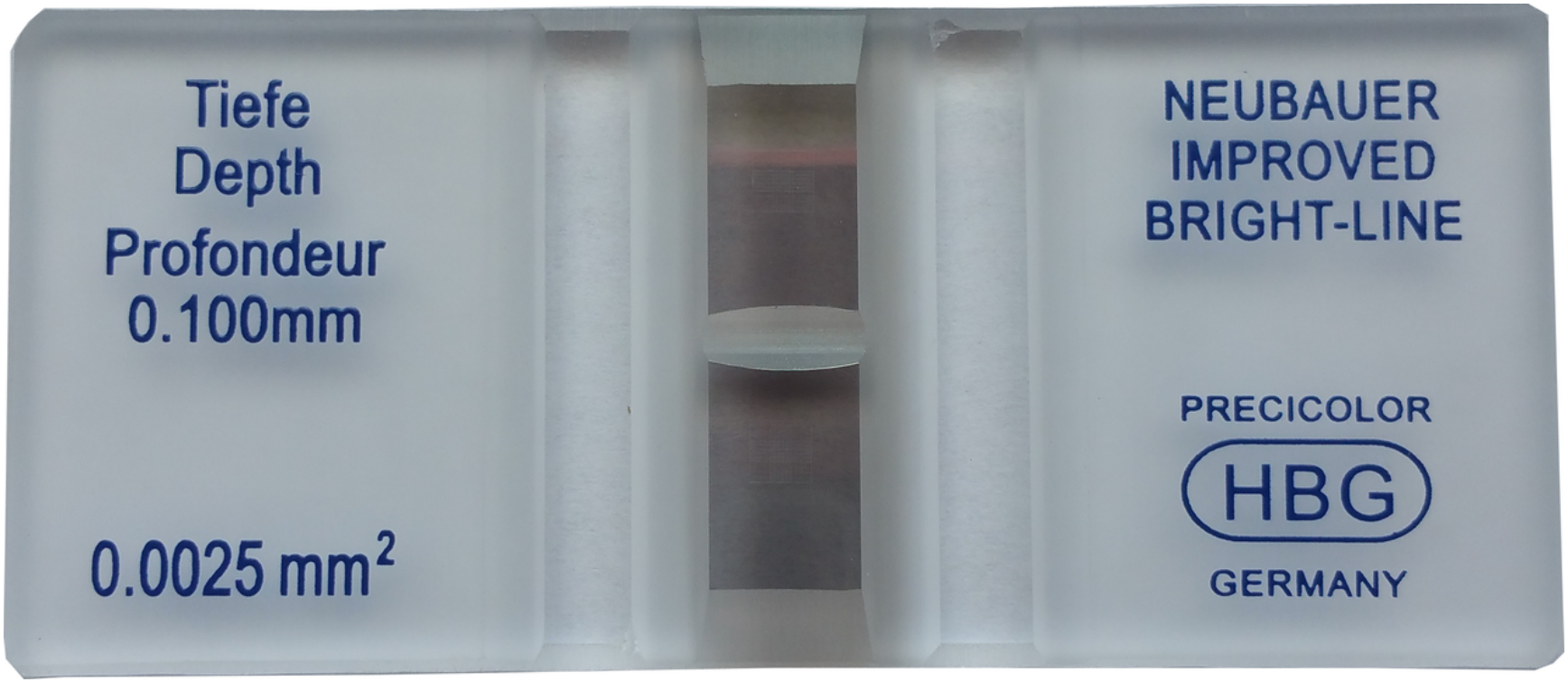
10.000 : 0,1 mm^3' deki sayım sonucunu 1 ml' deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

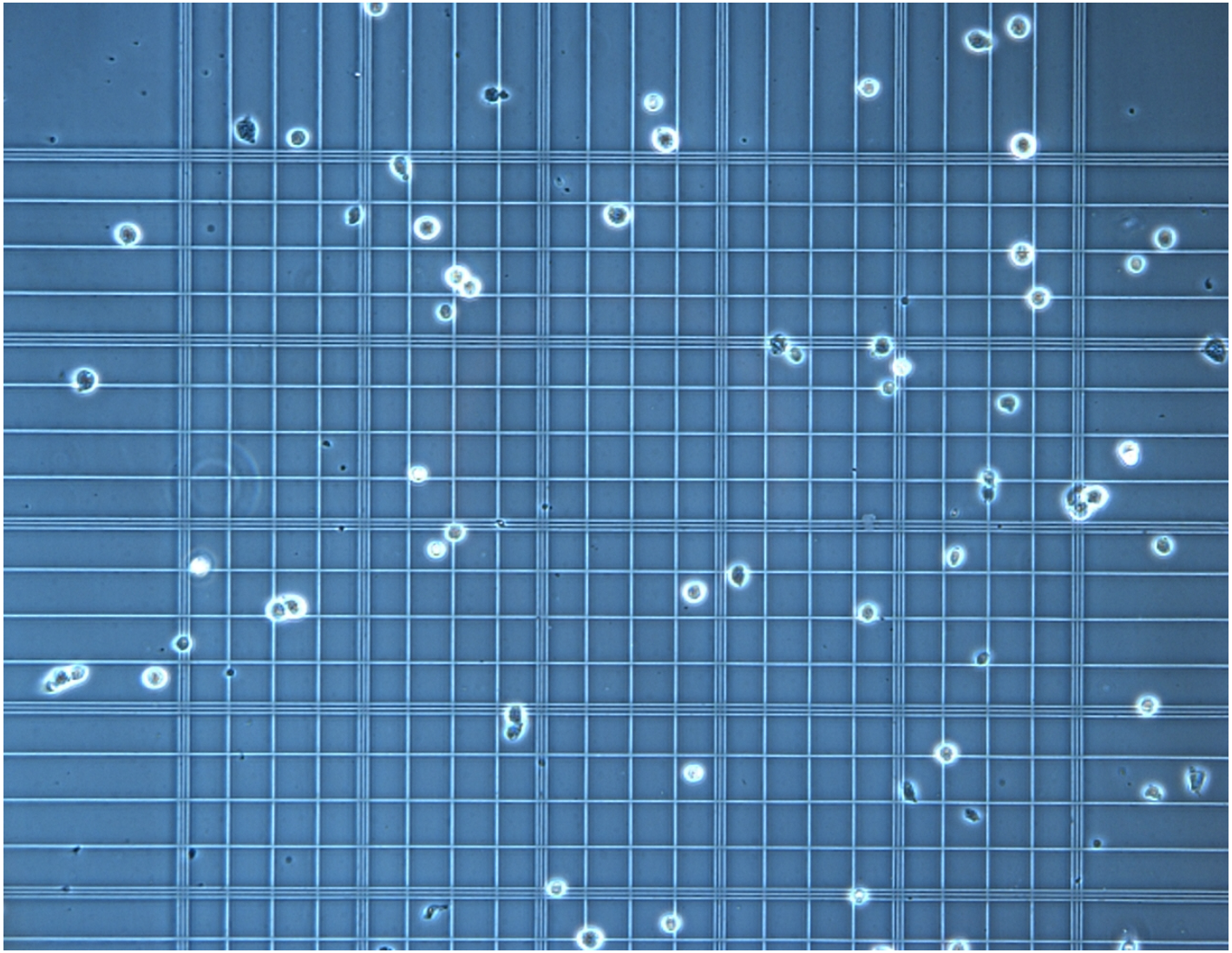


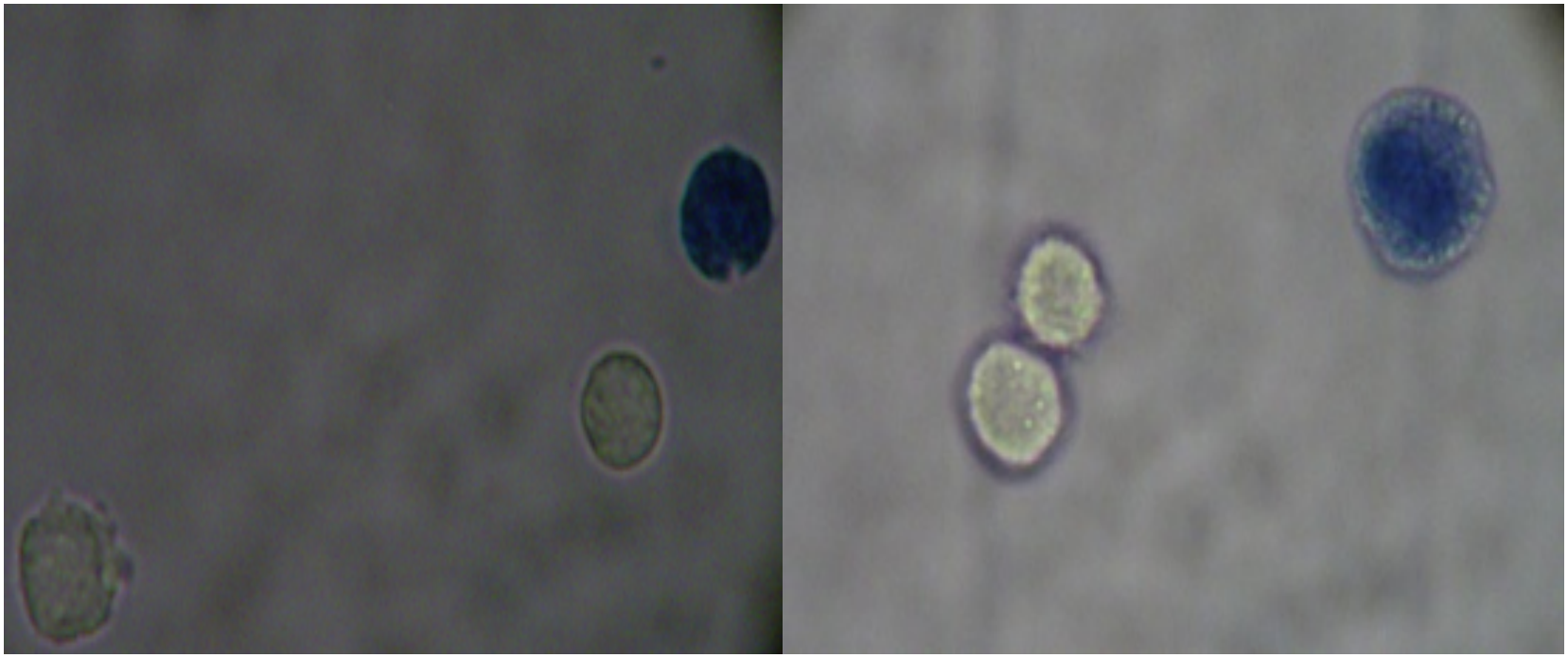
2. 500µl hücre ortamla birlikte mikrofüj tüpüne alınır. Eğer örnek hacmi azsa 100µl da


Tiefe · Depth
Profondeur
0,01 mm
0,0025 mm²
Neubauer
improved CE
MARIENFELD

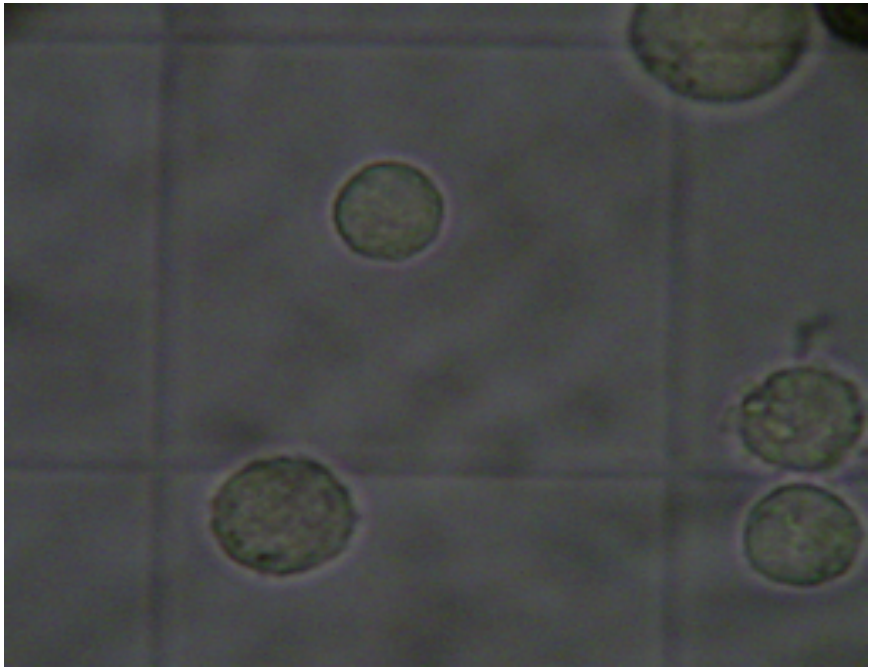

Tiefe · Depth
Profondeur
0,100mm
0,0025 mm²
Neubauer
improved
MARIENFELD
braukaiser.com

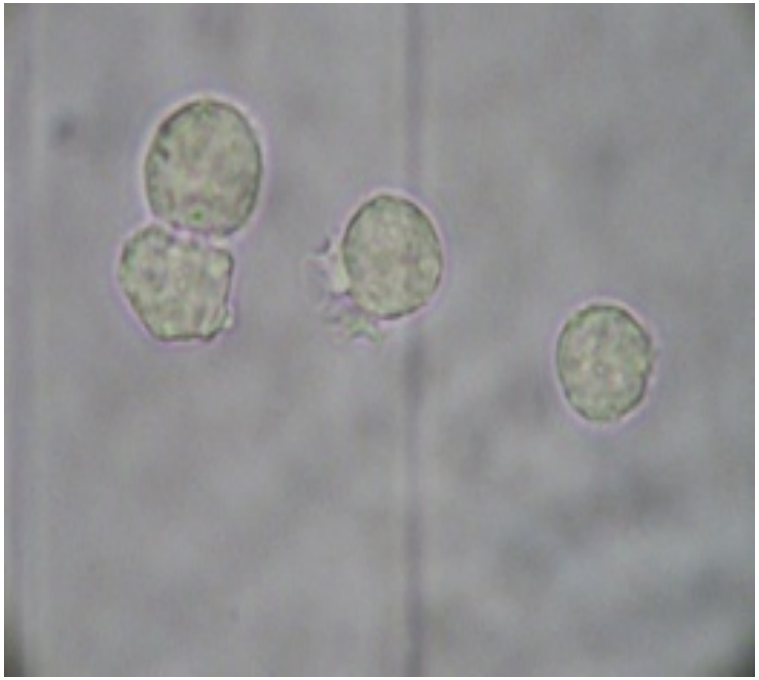

Tiefe
Depth
Profondeur
0.100mm
0.0025 mm²
NEUBAUER
IMPROVED
BRIGHT-LINE
PRECICOLOR
HBG
GERMANY





Trypan blue canlılık testi





Thoma lamı ile hücre sayımı

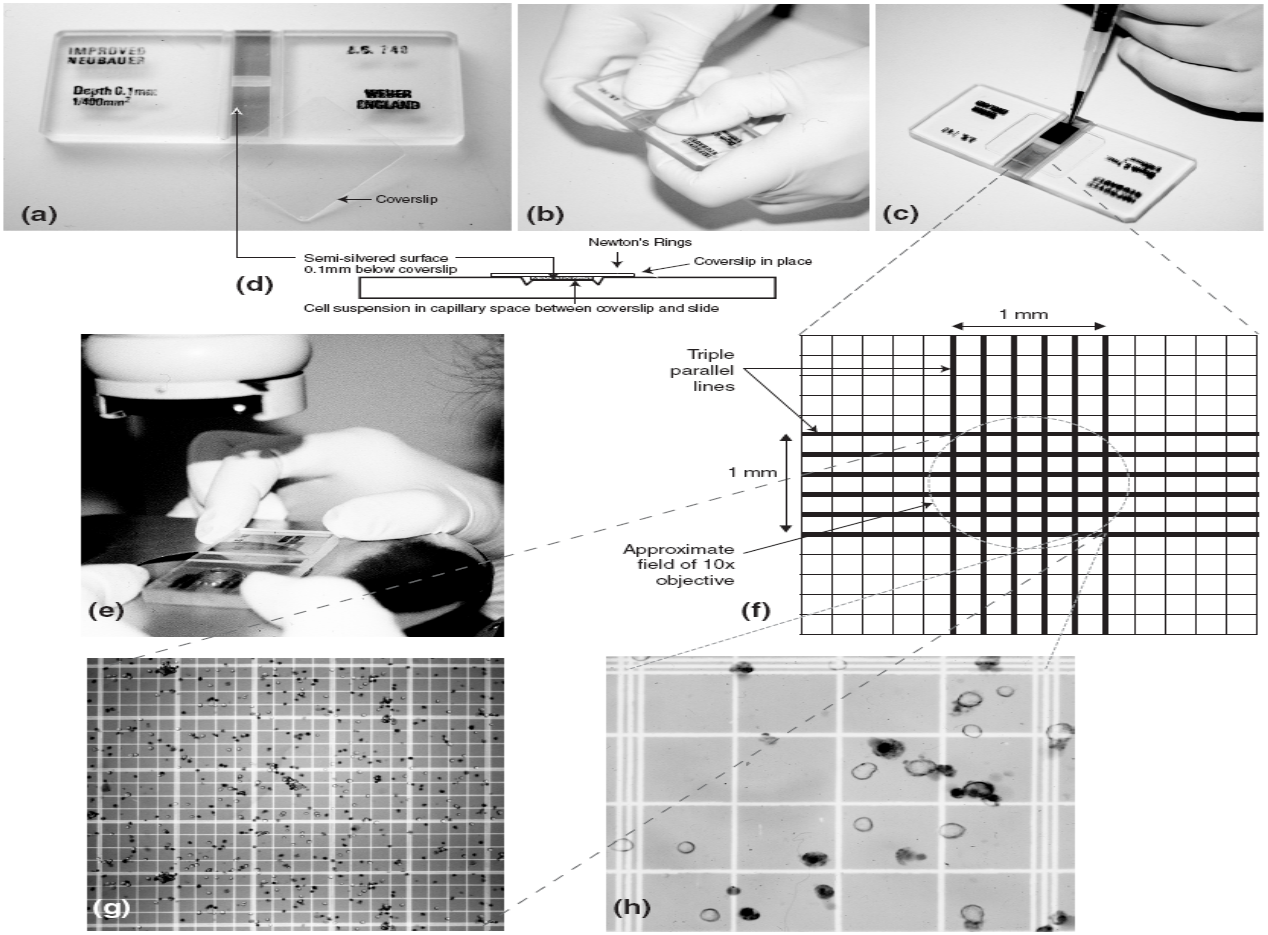


Fig. 21.1. Using a Hemocytometer Slide. (a) Hemocytometer slide (improved Neubauer) and coverslip before use. (b) Pressing coverslip down onto slide. (c) Adding a cell suspension to an assembled slide. (d) Longitudinal section of the slide, showing the position of the cell sample in a 0.1-mm-deep chamber. (e) Viewing slide on microscope. (f) Magnified view of the total area of the grid. The central area enclosed by the dotted circle is that area which would be covered by the average 10× objective. This area covers approximately the central 1 × 1 mm square of the grid. (g) Low-power (10× objective) microphotograph showing the 25 smaller 200 × 200-μm squares of a slide, which make up the central 1 × 1-mm square, loaded with cells pretreated with Naphthalene Black (Amido Black). (h) High-power (40× objective) microphotograph of one of the smaller 200-μm squares, bounded by three parallel lines and containing 16 of the smallest (50 × 50 μm) squares. Viable cells are unstained and clear, with a refractile ring around them; nonviable cells are dark and have no refractile ring.

Analiz: Yapılan sayımların ortalaması alınır ve aşağıdaki gibi örneğinin konsantrasyonu hesaplanır.

$$C = n \times 10^4$$

C= Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml)

n= Sayılan Hücre Sayısı

Örneğin hemositometrenin derinliği 0.1 mm ve kullanılan alan 1 mm^2 ve kullanılan örnek 1 mm^3 ise yukarıdaki formül uygulanır.

Mikroskop yardımıyla, 10x objektif kullanılarak hemositometrede tüm canlılık oranını belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanılır.

$$\text{Canlılık oranı (\% olarak)} = \frac{\text{Sayılan Canlı Hücre Miktarı}}{\text{Sayılan toplam hücre miktarı}} \times 100$$

Bu yöntem bazı dez avantajlarada sahiptir.

1. Bu yöntem hızlı olmakla beraber 10^6 hücre/ml den daha az yoğunluklarda %100 hassas olduğu söylenemez. Genelde günlük sayımlarda çok kullanılan ve pratik olduğu için tercih edilen bir metottur.
2. Ucuz ve pratik bir yöntemdir. 10^4 -10^7 hücre/ml yoğunluğu değerlendirilebilir. Hücreler süspansiyon halinde olmalıdır, yüzeye tutunmuş hücrelerin sayımında kullanılamaz.
3. Sağlıklı bir hücre kültüründe canlılık oranı en az %95 olmalıdır. Ancak bazı özel türlerinde (örneğin kanser hücreleri) daha az olabilir.
4. Doğru karar vermek için sayımı en az iki kez tekrarlamak gerekir ve ortalama hücre yoğunluğu hesaplanır.

HÜCRE SAYILARININ HESAPLANMASI

✓1 ml kültür medyumunda sulandırılan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpe konur ve üzerine 90 µl 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.

HÜCRE SAYILARININ HESAPLANMASI

✓ 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 $5x10^6$**
- **60 mm'lik kültür petrisine $2x\ 10^6$**
- **35 mm'lik kültür petrisine $1x10^6$**
- **24 kuyuluk kültür kabının her kuyusuna 125 bin hücre transfer edilmelidir.**