

HÜCRE KÜLTÜR TEKNİKLERİ

DERS 2

HÜCRE KÜLTÜR EKİPMANLARI

Doç.Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Hücre Kültür Odası



Biyogüvenlik, laboratuvarların potansiyel olarak bulaşıcı bir malzemeye maruz kalma riskini azaltan, çalışma ortamının ve nihayetinde topluluğun kontaminasyonunu sınırlayan güvenlik önlemlerinin uygulanmasıdır.

BIOHAZARD



Biosafety Level 2

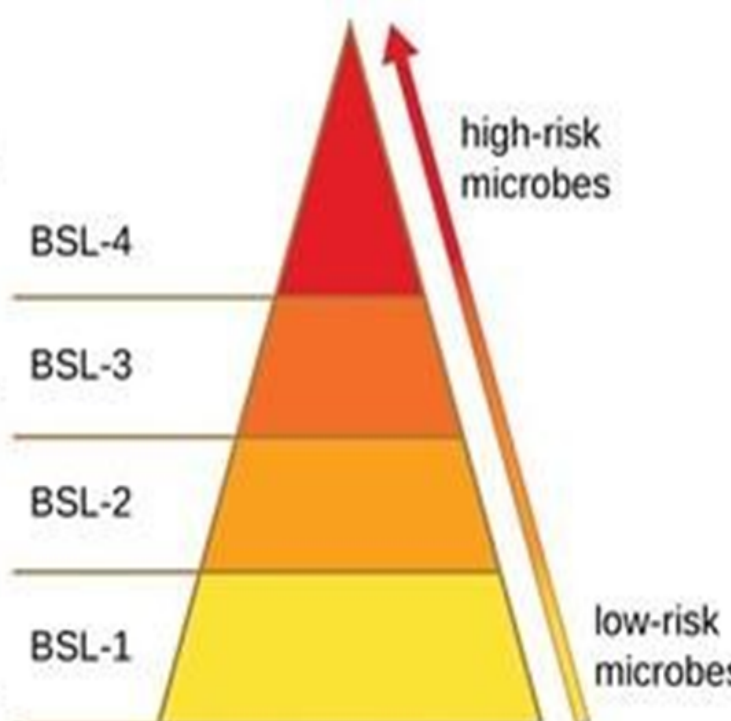
AUTHORIZED PERSONNEL ONLY

Why we need biosafety ????

- 1. Lab has hazards of processing infectious agents**
- 2. Accidental threat to workers and environment**
- 3. To have adherence with safety regulations while dealing with highly infectious agents**



Biosafety Levels

Biological Safety Levels	Description	Examples	CDC Classification
BSL-4	Microbes are dangerous and exotic, posing a high risk of aerosol-transmitted infections, which are frequently fatal without treatment or vaccines. Few labs are at this level.	Ebola and Marburg viruses	 high-risk microbes BSL-4 BSL-3 BSL-2 BSL-1 low-risk microbes
BSL-3	Microbes are indigenous or exotic and cause serious or potentially lethal diseases through respiratory transmission.	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
BSL-2	Microbes are typically indigenous and are associated with diseases of varying severity. They pose moderate risk to workers and the environment.	<i>Staphylococcus aureus</i>	
BSL-1	Microbes are not known to cause disease in healthy hosts and pose minimal risk to workers and the environment.	Nonpathogenic strains of <i>Escherichia coli</i>	

Biyogüvenlik Seviyesi 1(BSL-1)

BSL-1, çoğu araştırma ve klinik laboratuvarında ortak olan temel koruma seviyesidir. Normal ve sağlıklı insanlarda hastalığa neden olduğu bilinmeyen ajanlar için uygundur.

Biyogüvenlik Seviyesi 2(BSL-2)

- BSL-2, değişen şiddette insan hastalığına neden olduğu bilinen orta riskli ajanlar için uygundur. Bu ajanlar; yutmayla, perkütan yolla veya mukoza zarına maruz kalma yoluyla bulaşır.
- Çoğu hücre kültürü laboratuvarı en az BSL-2 seviyesinde olmalıdır ancak kesin gereksinimler kullanılan hücre hattına ve yapılan işin türüne bağlıdır.

Biyogüvenlik Seviyesi 3(BSL-3)

BSL-3, aerosol iletimi için bilinen bir potansiyele sahip ajanlar için uygundur. Bu ajanlar ciddi enfeksiyonlara ve hatta potansiyel olarak ölümcül enfeksiyonlara neden olabilir.

Biyogüvenlik Seviyesi 4(BSL-4)

- BSL-4, enfeksiyöz aerosoller tarafından yaşamı tehdit eden yüksek bir hastalık riski taşıyan ve tedavisi mümkün olmayan egzotik ajanlar için uygundur.
- Bu ajanlar ancak yüksek önleme sahip laboratuvarlarda çalışılabilir



BSL-4 Uygulamaları:

- Laboratuvara girmeden önce kıyafetleri değiştirmek
- Çıktıktan sonra duş almak
- Çıkmadan önce tüm malzemeleri dekontamine etmek
- Class III Biyogüvenlik Kabini(Class III BSC) kullanmak
- Laboratuvar binasını diğer binalardan ayırmak
- Vakum hatları ve dekontaminasyon sistemleri oluşturmak

Ekipman:

- Biyogüvenlik Kabini(BSC)
- İnkübatör
- Su banyosu
- Santrifüj
- Buzdolabı ve dondurucu(-20 °C)
- Hücre sayıcı(Otomatik hücre sayacı veya hemositometre)
- Ters mikroskop
- Sıvı nitrojen
- Otoklav

Genişletilmiş Ekipmanlar

- Aspirasyon pompası(Vakum)
- pH metre
- Konfokal mikroskop
- Akış sitometresi

Ek Gereçler:

- Hücre kültür kapları(örn., Şişeler, petri kapları, rulo şişeleri, çok oyuklu plakalar)
- Pipetler ve pipetleyiciler
- Şırıngalar ve iğneler
- Atık kapları
- Medya, serumlar ve reaktifler
- Hücreler

GİRİŞ

- Biyogüvenlik kabinleri, bulaşıcı mikroorganizmalarla güvenli bir şekilde çalışmak için geliştirilmiş **birincil muhafaza araçlarıdır.**
- Biyogüvenlik kabinleri, biyogüvenlik programının genel parçasıdır. Bu kabinlerin sürekli kullanımı
 - iyi mikrobiyolojik **uygulamalar**
 - birincil koruma **ekipmanları**
 - birincil koruma tesisi **tasarımı** gibi başlıkları içerir.

To be precise,



Biyogüvenlik kabinleri, uygun uygulamalar ve prosedürler uygulandığında personelin, çevrenin ve ürünün korumasını sağlayacak şekilde tasarlanmıştır.

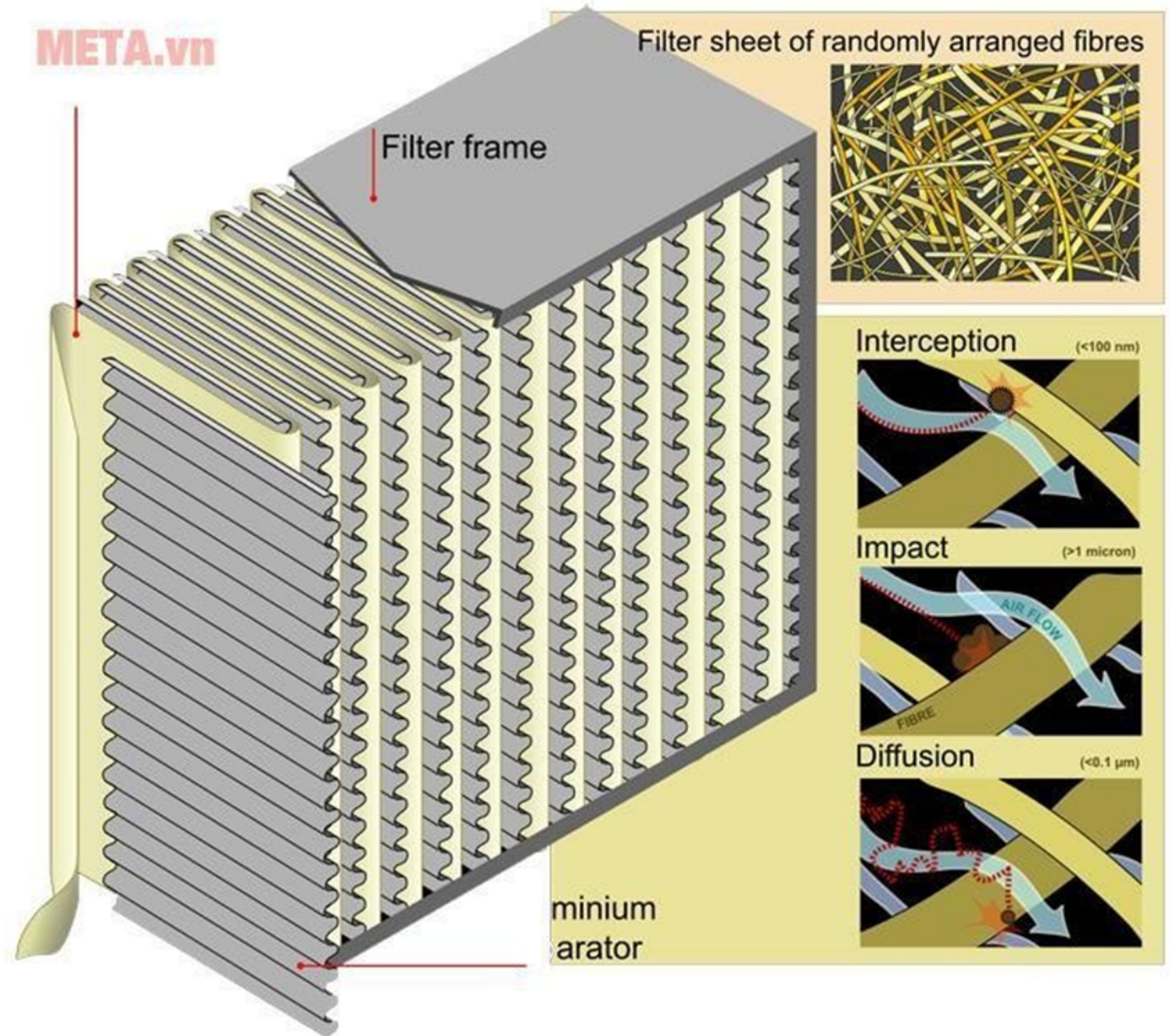
Adapted from CDC-BMBL- 5th Edition/1999

Appendix A – Primary Containment for Biohazards: Selection, Installation and Use of Biological Safety Cabinets

HEPA FİLTRE

- HEPA(High Efficiency Particulate Air filter) - Yüksek Etkinlikte Partikül Hava Filtresi
- 0.3 μm 'ye kadar olan partikül boyutunu en az %99.97 verimlilikle temizler.
- Tipik HEPA filtre, suya dirençli(su itici) bağlayıcı ile tek katmanlı borosilikat ipliklerinden oluşur.

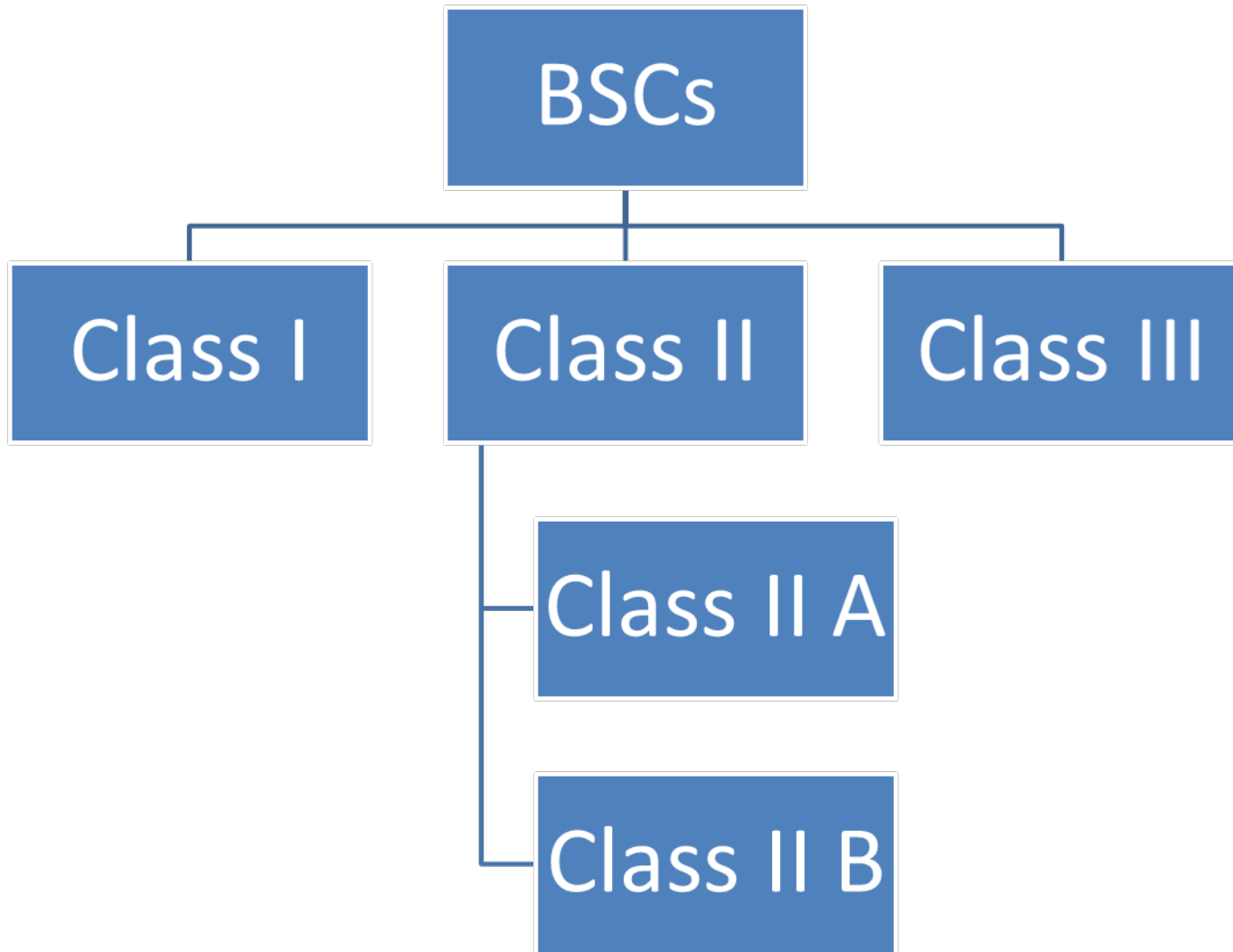
Hepa filtre



Biyogüvenlik Kabinlerinin Önemi

- Biyogüvenlik Kabinleri;
 - Bulaşıcı materyal ile çalışan **personel**
 - Mikropların salınmasını önleyerek **çevre**
 - **Ürün** (Hücre Kültürünün) için koruma sağlar.

Biyogüvenlik Kabinlerinin Sınıflandırılması



Sınıf I Kabinler

- Sınıf I Kabinler; iyi mikrobiyolojik tekniklerle kullanıldığında laboratuvar personeline ve çevreye önemli düzeyde koruma sağlar.
- Ancak bu kabinler kültürler için kontaminasyondan koruma sağlamazlar.
- Tasarım ve hava akış özellikleri bakımından kimyasal çeker ocaklara benzerler.

CLASS I cabinet



HEPA filter



Room Air



Potentially
contaminated
air



HEPA
Filtered
air



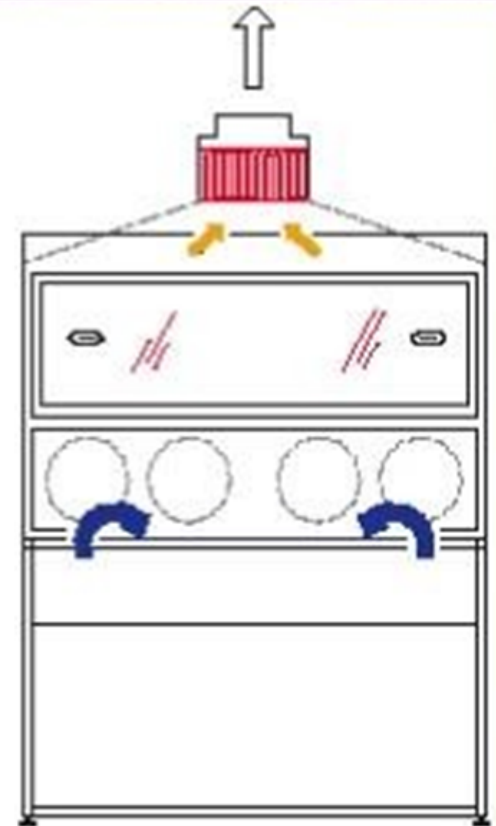
Positive pressure



Negative pressure



Section View

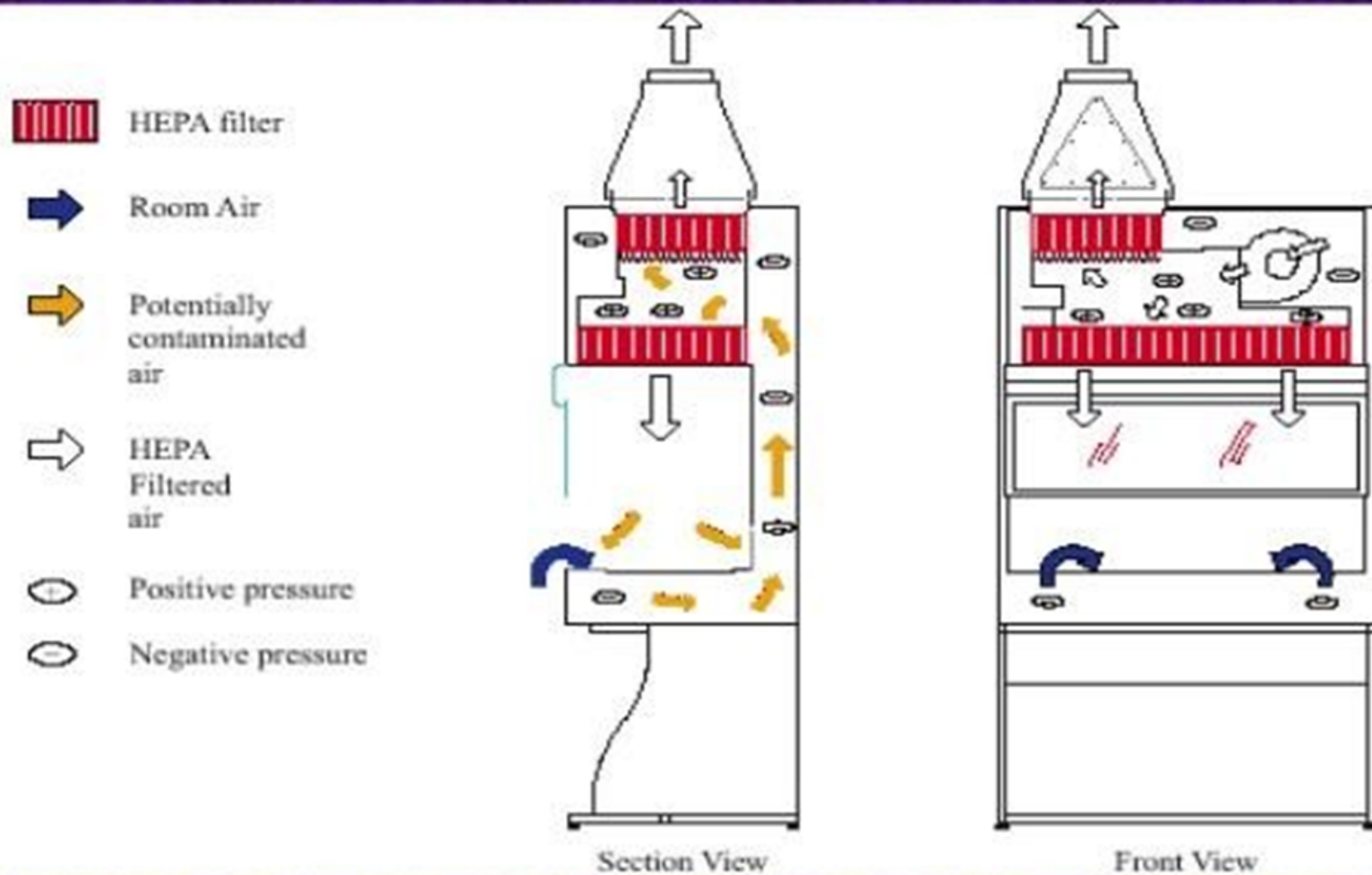


Front View

Sınıf II Kabinler

- Sınıf II Kabinleri; biyogüvenlik seviyesi 1, 2 ve 3 materyallerini içeren işler için tasarlanmıştır. Ayrıca Bu kabinler hücre kültürü deneyleri için gerekli aseptik bir ortam sağlarlar.
- Potansiyel olarak tehlikeli maddeler (örn., Primat türevli kültürler, viral enfekte kültürler, kanserojen veya toksik reaktifler) ile çalışılması durumunda Sınıf II biyogüvenlik kabini kullanılmalıdır.

CLASS II A2

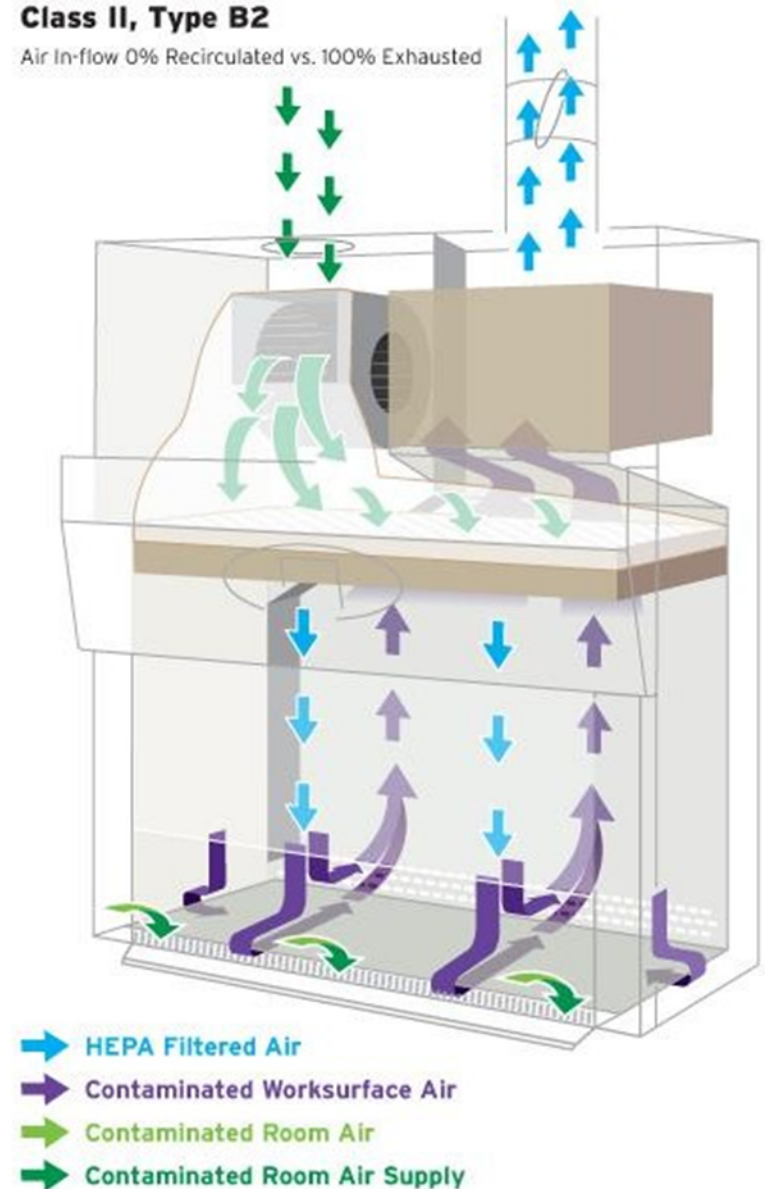


Sınıf II A

- HEPA filtreli tek yönlü hava akışı
- % 30 oranında laboratuvar içerisine gönderilen HEPA filtreli egzoz havası
- Havanın % 70'i tekrar kabin içinde devir daim edilir
- Radyonüklidler veya uçucu maddelerle çalışmaya uygun değildir

Sınıf II B

- Hava binanın dışına aktarılır
- Hava kabinlerinde yeniden sirküle edilmez.
- Radyonüklidler veya uçucu maddelerle çalışmaya uygundur.



Sınıf III Biyogüvenlik Kabinleri

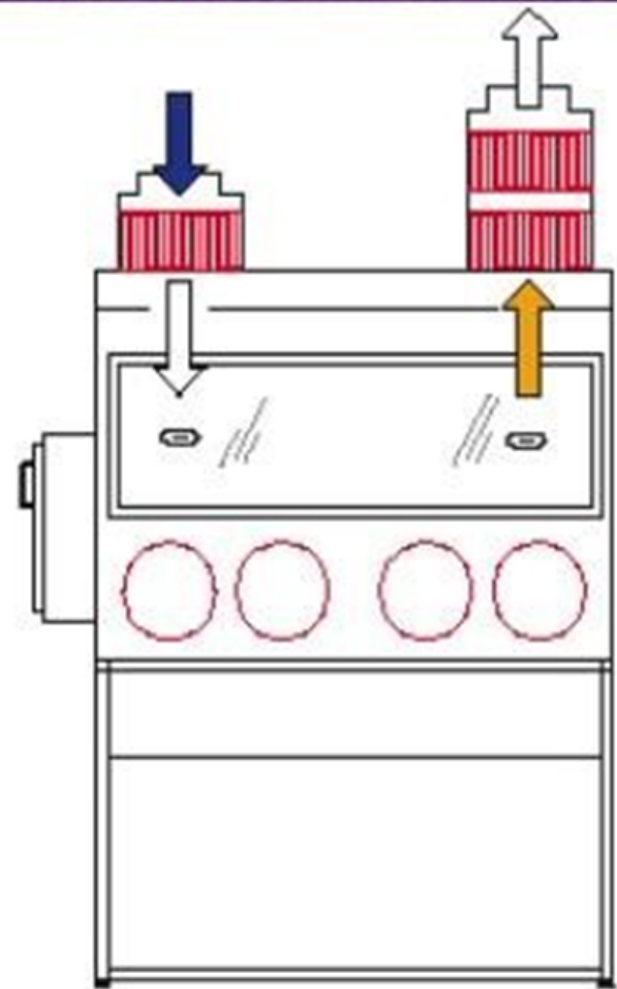
- Sınıf III biyogüvenlik kabinleri gaz sızdırmazdır. Bu kabinler, personel ve çevre için mümkün olan en yüksek seviyede koruma sağlar.
- Bilinen insan patojenlerini ve diğer BSL-4 malzemelerini içeren çalışmalar için Class III biyogüvenlik kabini gereklidir.

Class III

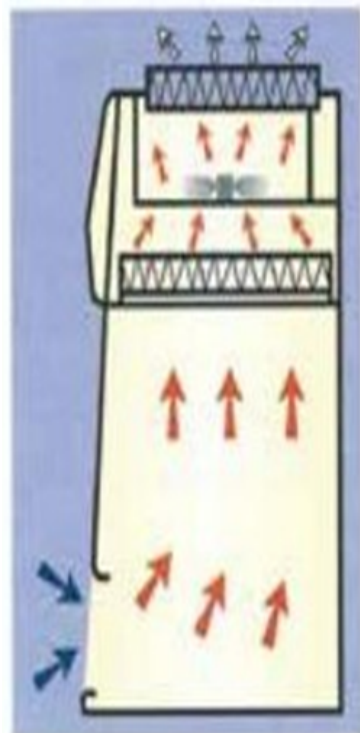
-  HEPA filter
-  Room Air
-  Potentially contaminated air
-  HEPA Filtered air
-  Positive pressure
-  Negative pressure



Section View



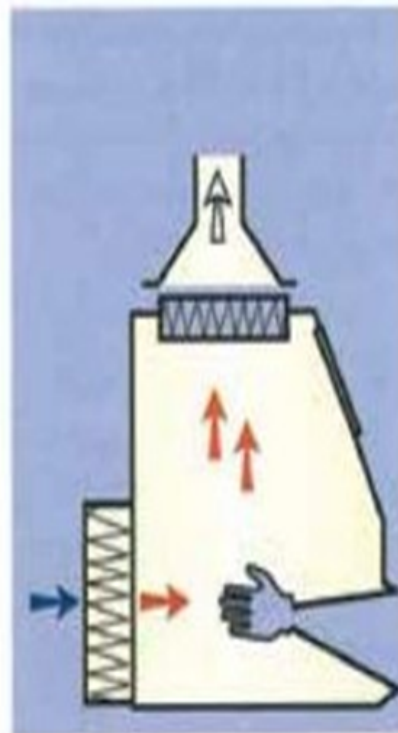
Front View



Class I



Class 2



Class 3



Biyogüvenlik kabinlerinin hava akış karakteristiği

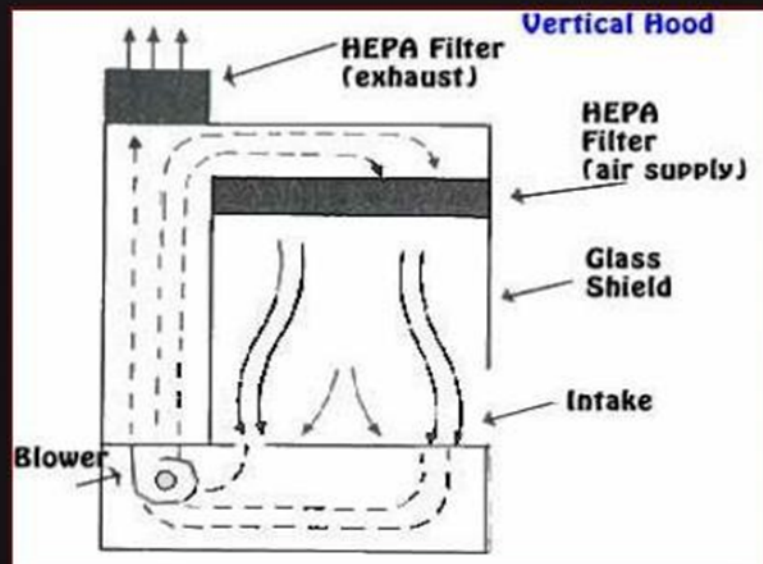
- Biyogüvenlik kabinleri; çalışma alanı üzerinde sabit ve tek yönlü bir HEPA filtreli hava akışı sağlayarak çalışma ortamını tozdan ve diğer hava kaynaklı kirleticilerden korur.
- Akış yatay olabilir, çalışma yüzeyine paralel olarak üflenebilir veya kabinin üstünden çalışma yüzeyine üflenerek dikey olabilir.

Biyogüvenlik kabinlerinin hava akış karakteristiği

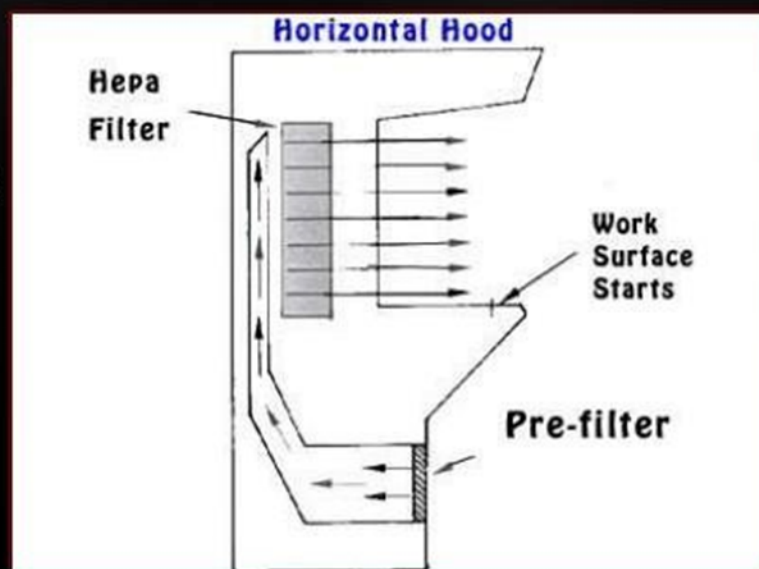
- Tasarımına bağlı olarak, yatay bir akış başlığı kültüre (eğer hava kullanıcıya doğru akıyorsa) veya kullanıcıya (hava, içindeki negatif hava basıncı ile kabinin önünden içeri çekilirse) koruma sağlar.
- Dikey akış kabinleri ise hem kullanıcıya hem de hücre kültürüne önemli bir koruma sağlar.

Laminar flow hood (Biological safety cabinet)

1. Vertical mode



2. Horizontal mode



- Tryptose Soya Broth agar kullanılarak kontaminasyon kontrolü yapılır.
- Plaklar en az dört saat boyunca kabin içinde tutulur. Bu yöntem kabinin ne kadar temiz olduğunu belirler.
- Bu tür plakalarda inkübasyondan
 - 3 gün sonra «Bakteri»
 - 5 gün sonra «Mantar» üremesi olmamalıdır.



- Çoğu durumda, Class II biyogüvenlik kabini hayvan hücre kültürü için yeterlidir.
- Bununla birlikte, her çalışma tehlike riski açısından ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Bilinen bir virüs enfeksiyonu veya belirsiz bir köken gibi ek faktörlerin daha yüksek düzeyde önlem gerektirmesi mümkündür.

Biosafety Cabinet (Area Classification)

Class I

- Offer significant levels of protection to laboratory personnel and to the environment when used with good microbiological technique.
- But they do not provide cultures protection from contamination. They are similar in design and air flow characteristics to chemical fume hoods.
- Used in general microbiological research with low and moderate risk agents.

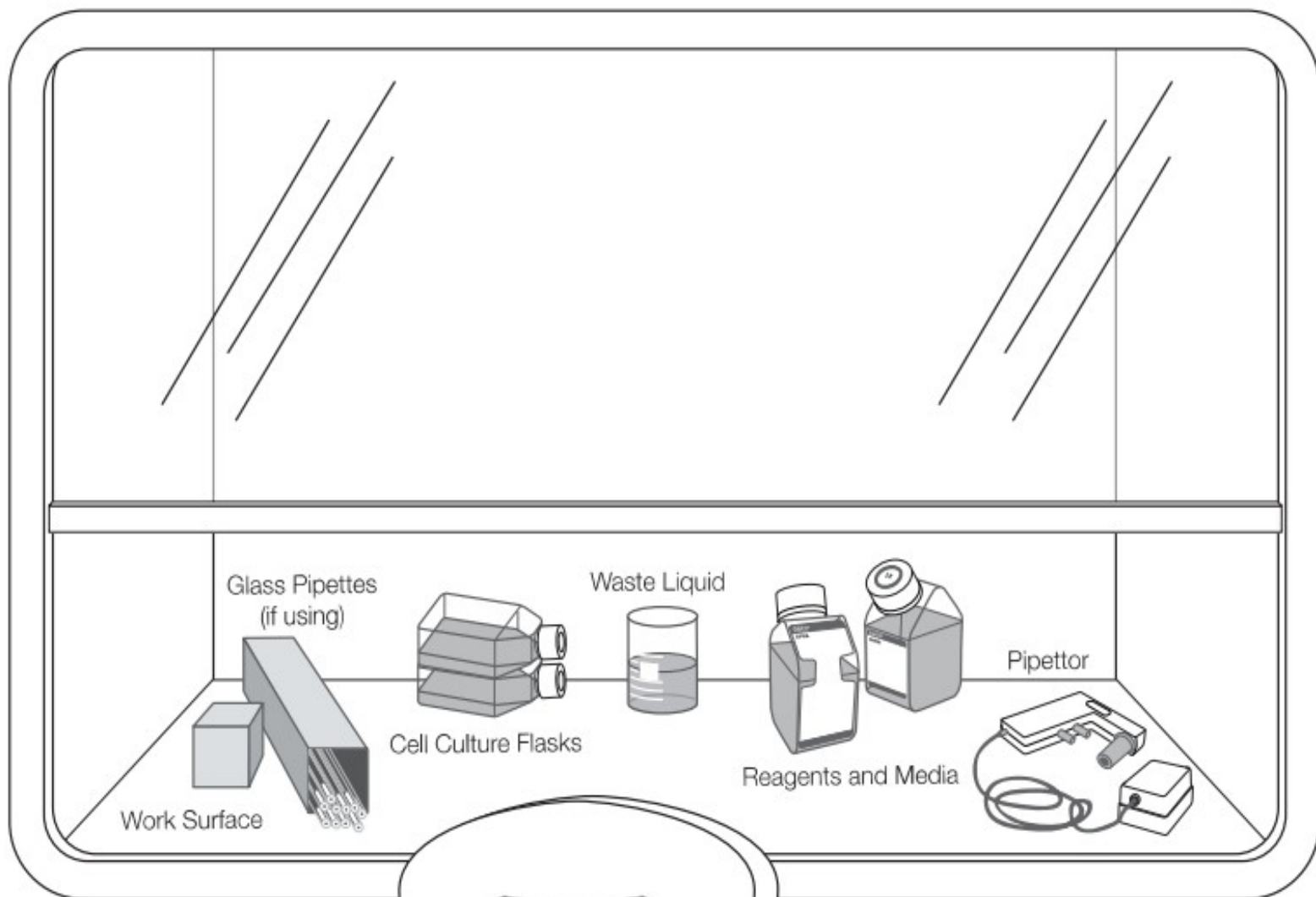
Class II

- Designed for work involving BSL-1,2, and 3 materials, and they also provide an aseptic environment necessary for cell culture experiments.
- Used for handling potentially hazardous materials (e.g. primate-derived cultures, virally infected cultures, radioisotopes, carcinogenic or toxic reagents).

Class III

- Gas-tight, and they provide the highest attainable level of protection to personnel and the environment.
- A class III biosafety cabinet is required for work involving known human pathogens and other BSL-4 materials.

Wrapped
Disposable
Pipettes



Glass Pipettes
(if using)

Waste Liquid

Pipettor

Cell Culture Flasks

Reagents and Media

Work Surface

Waste Container



Depolama

- Bir hücre kültürü laboratuvarı;
 - media ve reaktifler gibi sıvılar,
 - ilaçlar ve antibiyotikler gibi kimyasallar,
 - tek kullanımlık pipetler, kültür kapları ve eldivenler gibi sarf malzemeleri,
 - medya şişeleri ve cam pipetler gibi cam eşyalar
 - dokular ve hücreler için depolama alanları içermelidir.

- Cam eşyalar, plastik ve özel ekipmanlar oda sıcaklığında raflarda ve çekmecelerde saklanabilir;
- Bununla birlikte tüm mediayı, reaktifleri ve kimyasalları etiketteki talimatlara göre saklamak önemlidir.

Buzdolapları

- Küçük hücre kültürü laboratuvarları için, ev tipi bir buzdolabı (tercihen bir otodefrost dondurucu olmadan), reaktifleri ve mediayı 2-8 ° C'de saklamak için yeterli ve ucuz bir ekipman parçasıdır.

- Daha büyük laboratuvarlarda, sadece hücre kültürü çalışmaları için kullanılan soğuk bir oda daha uygundur.
- Kontaminasyonu önlemek için buzdolabı veya soğuk oda düzenli olarak temizlenmelidir.



Dondurucular

- Çoğu hücre kültürü reaktifleri -5°C ila -20°C arasında saklanabilir; bu nedenle, çoğu reaktifin depolanması için kullanılan ultra derin dondurucu (yani -80°C derin dondurucu) isteğe bağlıdır.
- Ev tipi bir dondurucu laboratuvar tipi dondurucuya ucuz bir alternatiftir.
- Çoğu reaktif otodefrost (yani kendi kendine çözülen) dondurucudaki sıcaklık değişimlerine dayanabilse de, antibiyotik ve enzim gibi reaktifler otodefrost olmayan bir dondurucuda saklanmalıdır.

Buzdolabı ve Dondurucular(-20 °C)

- Her iki cihaz da sıvı ortamın 4 ° C'de; enzimlerin (örn. Tripsin) ve bazı ortam bileşenlerinin (örn. Glutamin ve serum) - 20 ° C'de depolanması için çok önemlidir.
- Ortamı ve tamponları saklamak için bir buzdolabı veya soğuk oda gereklidir. Önceden alikotlanmış serum, besin ve antibiyotik stoklarını tutmak için bir dondurucu gereklidir. Reaktifler -20 ° C'de saklanabilir.
- Uzun süreli koruma için, hücreler sıvı azot veya -70 ° C'lik bir dondurucuda muhafaza edilebilir.

Fridges and freezer (-20 °C)



İnkübatörler

- Hücre kültürleri büyümek için sıkı kontrol edilen bir ortam gerektirir.
- Özel inkübatörler, sıcaklık, nem derecesi ve CO₂ seviyeleri gibi doğru büyüme koşullarını kontrollü ve kararlı bir şekilde sağlamak için rutin olarak kullanılır.

- Genel olarak, 28 ° C (böcek hücre hatları için) ila 37 ° C (memeli hücre hatları için) arasındaki sıcaklıklarda çalışacak şekilde ve gereken seviyede CO₂(örn.% 5-10) temin edecek şekilde ayarlanabilir.
- Bazı inkübatörler O₂ seviyelerini kontrol etme imkanına da sahiptir.

Temel olarak 2 tipte inkübatör vardır.

1. Kuru inkübatör

2. Nemli CO2 inkübatörü



- Kuru inkübatörler daha ekonomiktir, ancak hücre kültürlerinin buharlaşmasını önlemek için kapalı şişelerde inkübe edilmesini gerektirir.
- Bir su kabını kuru bir inkübatöre yerleştirmek biraz nem sağlayabilir, ancak inkübatördeki atmosferik koşulların kesin kontrolüne izin vermez.
- Nemli CO2 inkübatörleri daha pahalıdır, ancak kültür koşullarının üstün kontrolüne izin verir.
- Yüksek nem ve artan CO2 sayesinde kontrollü bir atmosfer gerektiren petri kaplarında veya çok oyuklu plakalarda kültürlen hücreleri inkübe etmek için kullanılabilirler.

Kriyojenik Depolama

- Sürekli kültürlerdeki hücre hatlarının pasaj sayıları arttıkça genetik kararsızlık göstermeleri muhtemeldir;
- Bu nedenle hücrelerin çalışma stoklarının hazırlanması ve kriyojenik depoda muhafaza edilmesi önemlidir.
- Hücreler -20°C veya -80°C derin dondurucularda saklanmamalıdır. Çünkü bu sıcaklık aralığı hücrelerin canlılığını azaltır.

CRITICAL EQUIPMENT (Cryogenic Storage)

Cryogenic Storage

- Two main types of liquid-nitrogen storage systems, **vapor phase** and **liquid phase**.
- **Vapor phase**- minimize the risk of explosion with cryostorage tubes, and are required for storing biohazardous materials.
- **Liquid phase**- usually have longer static holding times, more economical.
- **Narrow-necked containers**- slower nitrogen evaporation rate, economical.
- **Wide-necked containers**- allow easier access and have a larger storage capacity.



Vapor phase



Liquid Phase

Soğutucu Santrifüj

- Santrifüj, partikülleri merkezkaç kuvveti prensibini kullanarak boyutlarına, şekline, yoğunluğuna, ortamın viskozitesine ve rotor hızına göre bir çözeltiden ayırmak için kullanılan bir alettir.
- Soğutmalı santrifüj, hücreleri kriyoprezervasyona hazırlamak için kullanılır.



Ters Mikroskop

- Ters mikroskop, ışık kaynağının ve merceğin numuneye göre üst tarafta, objektiflerin ise alt tarafta yer aldığı bir mikroskop türüdür.
- Ters mikroskoplar, geleneksel mikroskopta olduğu gibi bir cam slaytta daha doğal koşullar altındaki hücreleri değil büyük bir kabın dibindeki canlı hücreleri gözlemlemek için yararlıdır.

Inverted Microscope



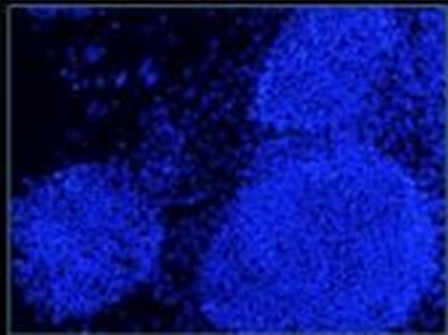
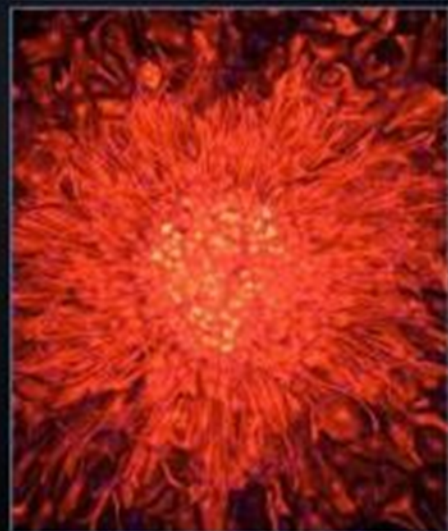
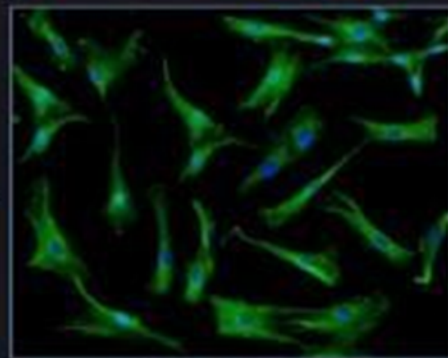
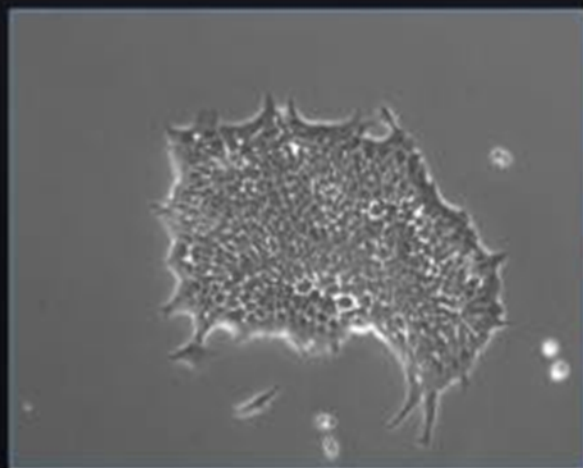
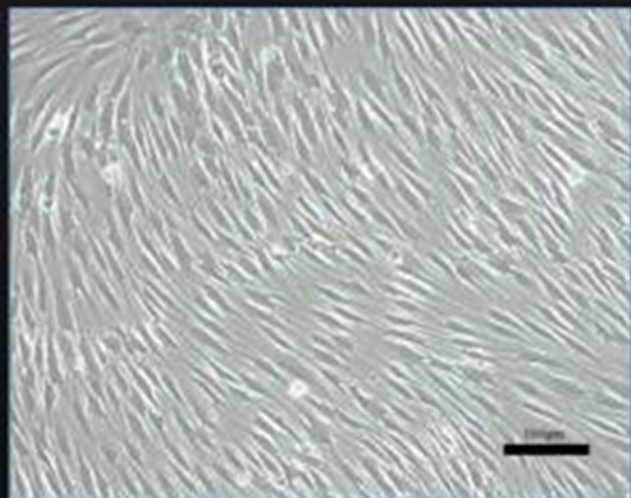
Inverted microscope



Fluorescent inverted microscope



Stereo or dissecting
microscope



Otoklav

- Otoklav, yükseltilmiş sıcaklık ve basınç altında sterilizasyon işlemini gerçekleştirmek için kullanılan bir basınç bölmesidir.



Ek Ekipman

- Aspirasyon pompası
- pH metre



• Aspiration pump



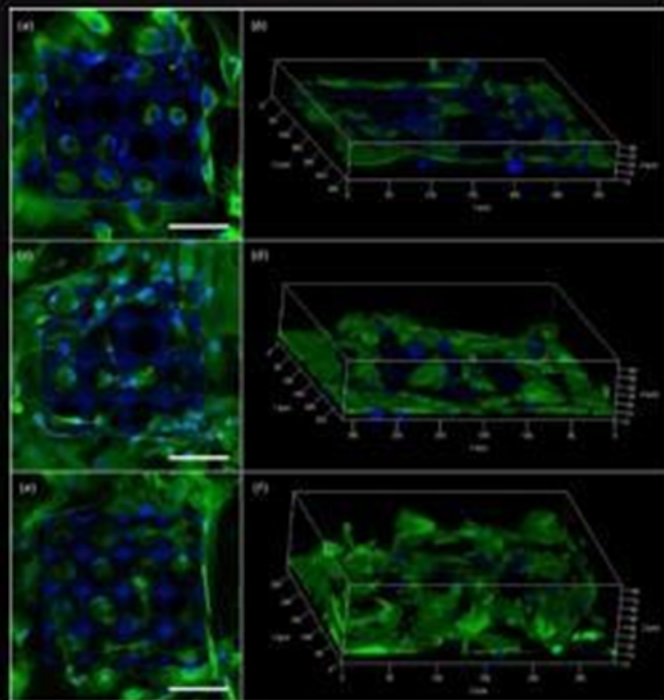
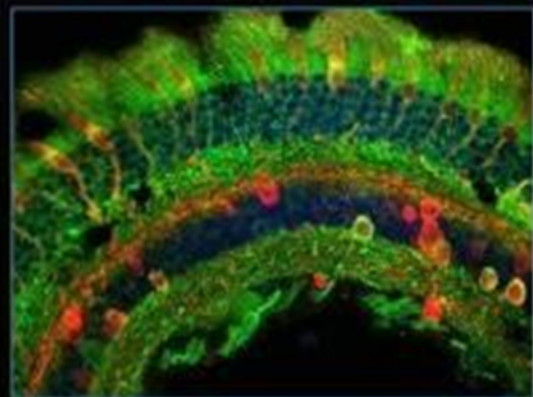
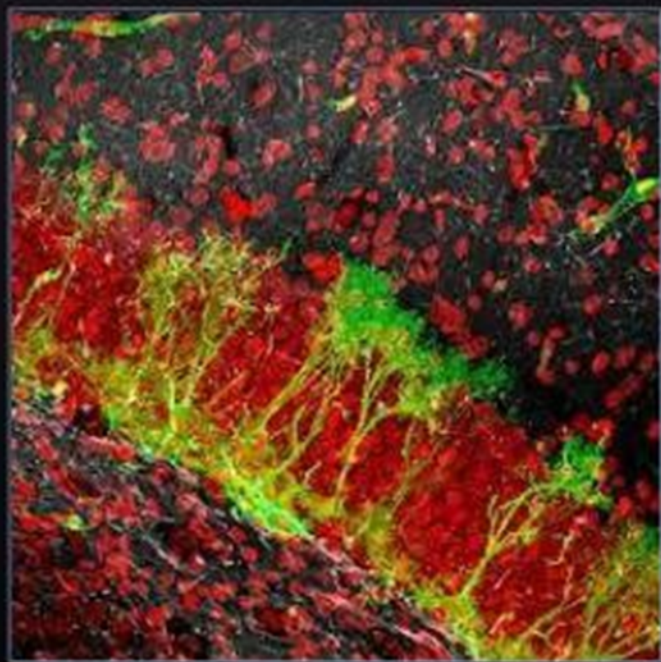
pH meter

Konfokal Mikroskop

Konfokal mikroskop, bir mikrografın optik çözünürlüğünü ve kontrastını arttıran optik bir görüntüleme tekniğidir. Elde edilen görüntülerden üç boyutlu yapıların yeniden oluşturulması sağlar.

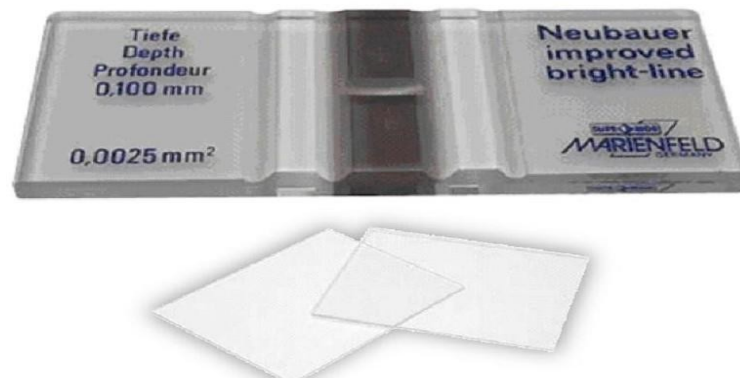


Confocal microscopy



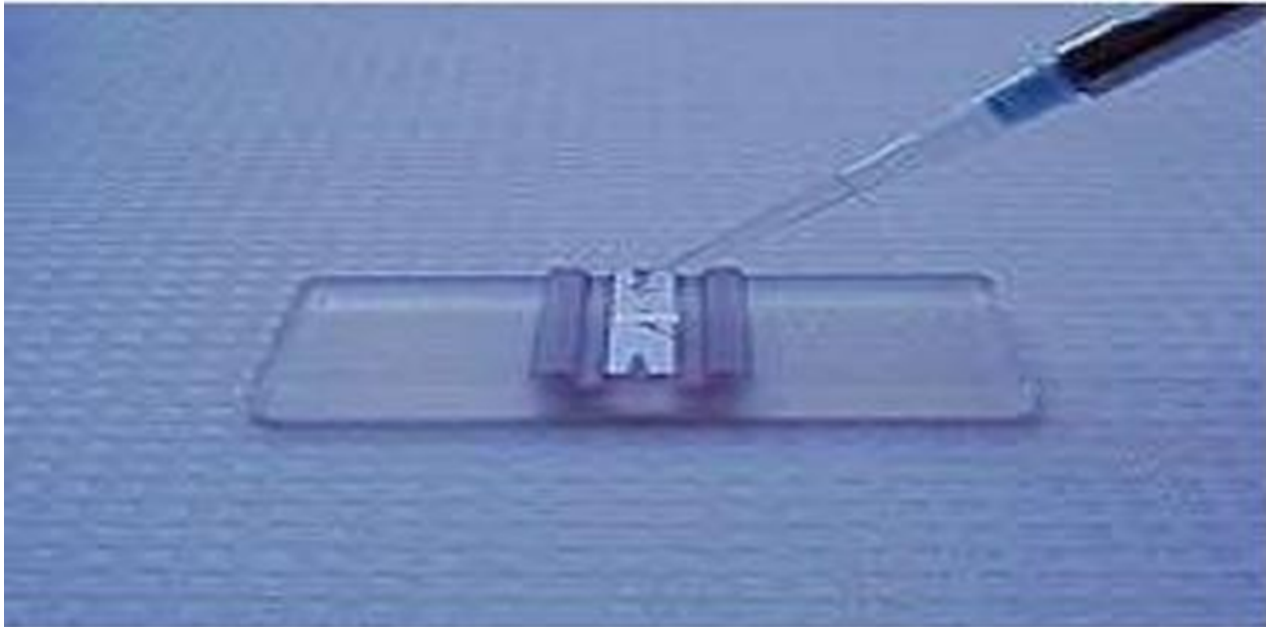
Hücre Sayıcı(Hemasitometre)

- Kantitatif büyüme kinetiği için bir hücre sayacı gereklidir ve laboratuvarlarda iki veya üçten fazla hücre hattı kültürlendiğinde büyük avantaj sağlar.



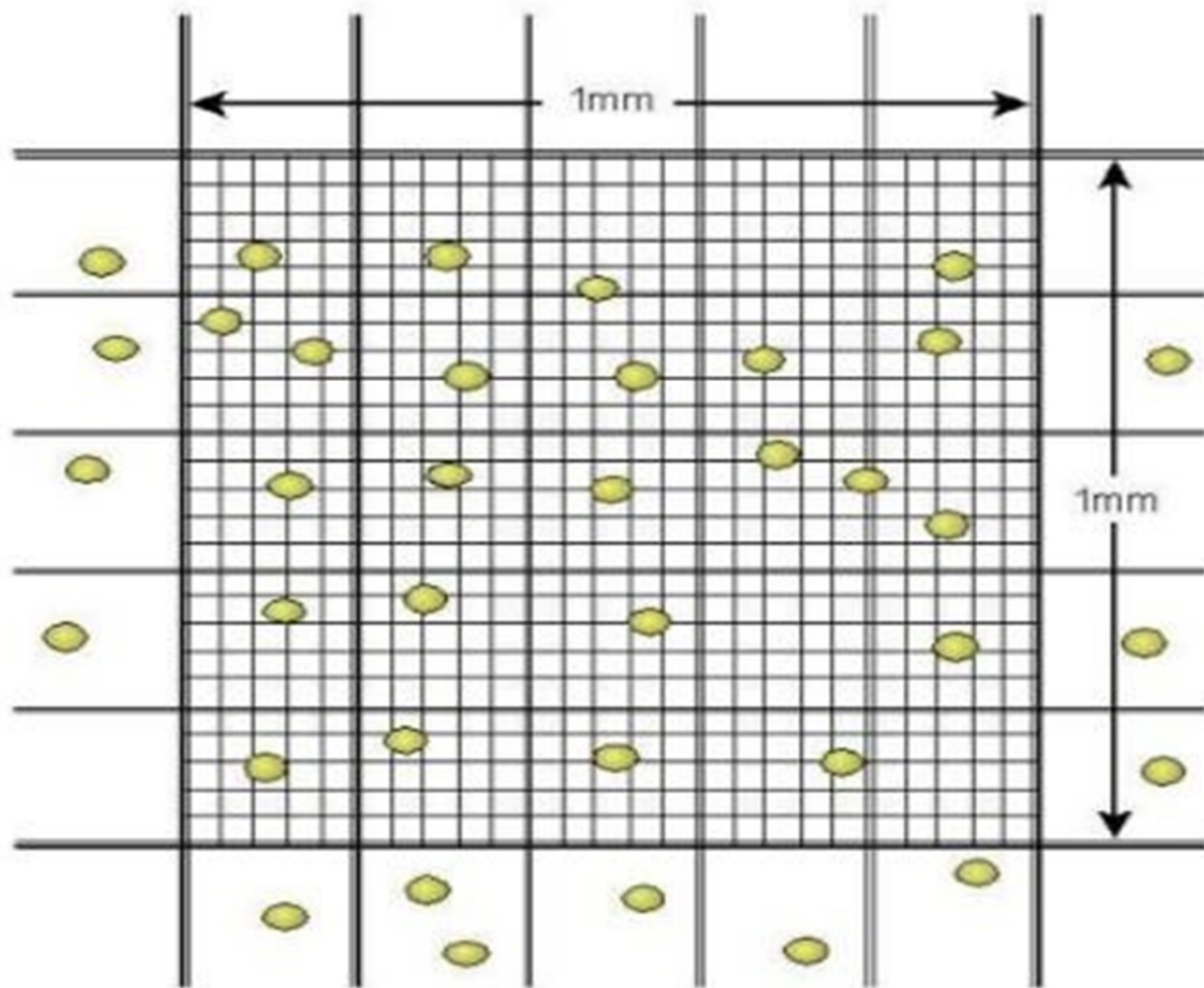


The two semi-reflective rectangles are the counting chambers.

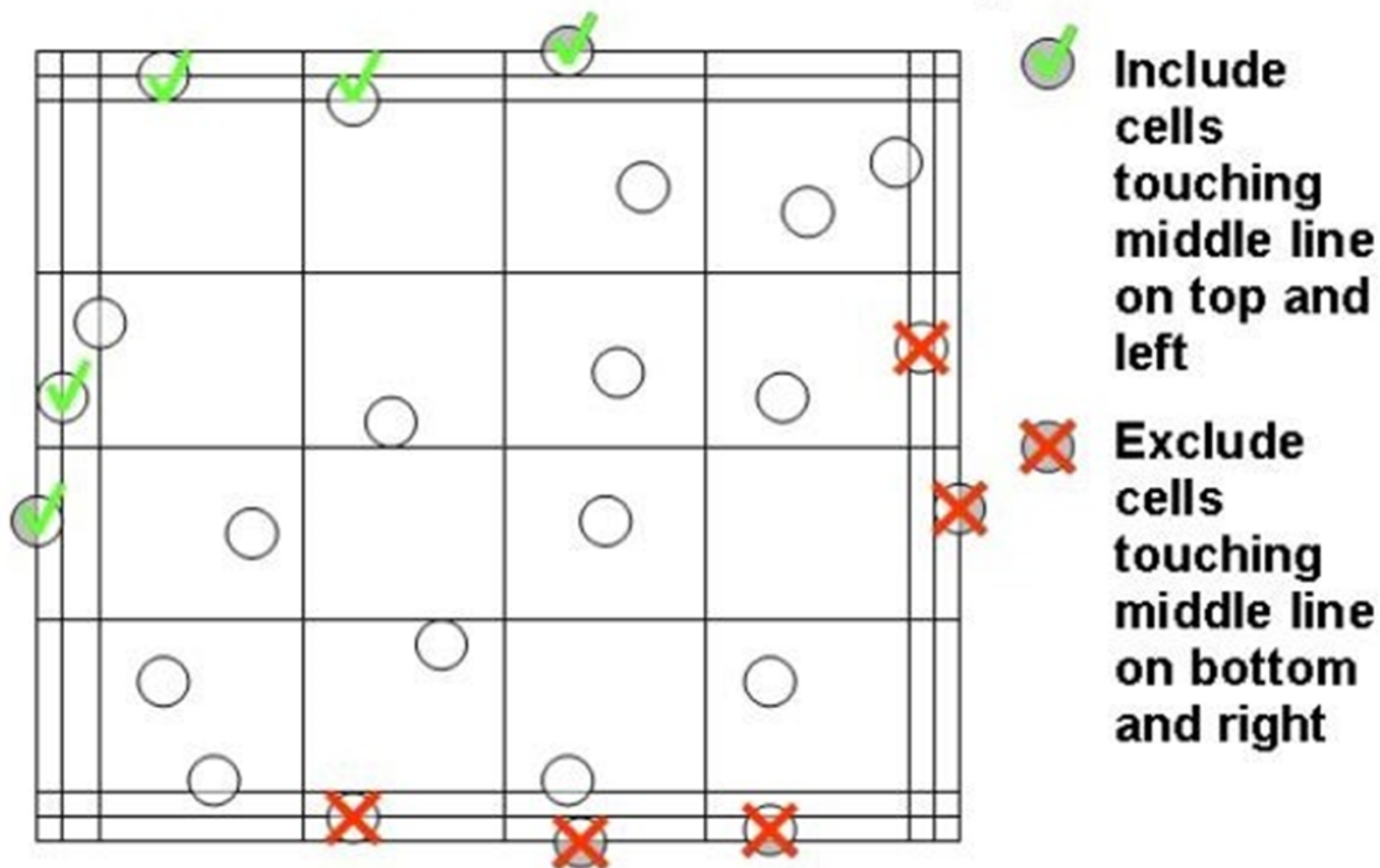


Load a chamber

Close up view of a grid with cells

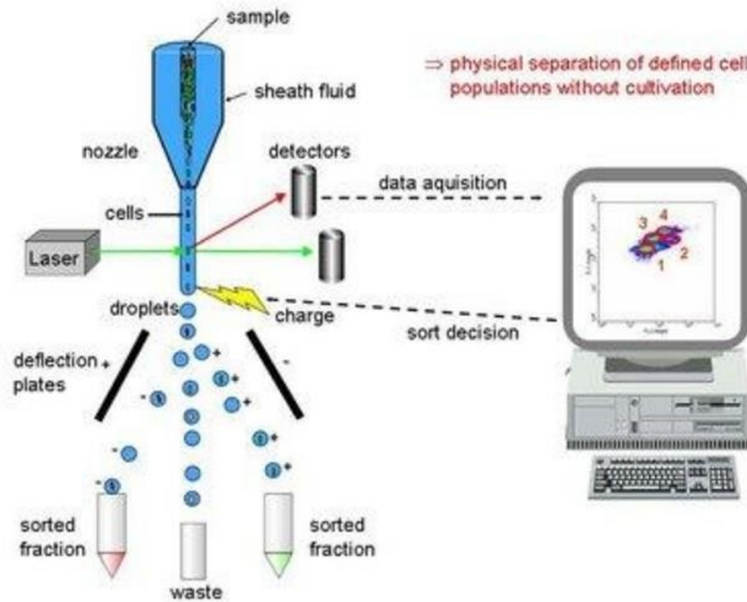


Counting system to ensure accuracy and consistency



Akış Sitometresi

- Akış sitometrisi, hücreleri bir akışkan aracılığıyla süspanse hale getiren ve bunları bir elektronik algılama aparatından geçiren hücre sayımı, hücre ayırıştırma, biyomarker belirleme ve protein mühendisliğinde kullanılan lazer tabanlı bir biyofiziksel teknolojidir.



Polystyrene Flasks for tissue culture



Hücre Kültür Kapları

- Flasklar
 - Plastik flasklar, birkaç farklı boyun tasarımına sahip farklı yüzey alanlarında ve şekillerde bulunabilir.
 - Flaskların yüzeyi adherent hücrelerin tutunması için özel olarak tasarlanmıştır.

Description	Growth area (cm ²)	Recommended working volume (mL)	Cell yield*
T-25	25	5 – 10	2.5×10^6
T-75	75	15 – 25	7.5×10^6
T-150	150	30 - 50	15×10^6
T-175	175	35 - 60	17.5×10^6
T-225	225	45 - 75	22.5×10^6

*Cell line dependent. Based upon a density of 1×10^5 cells/cm².

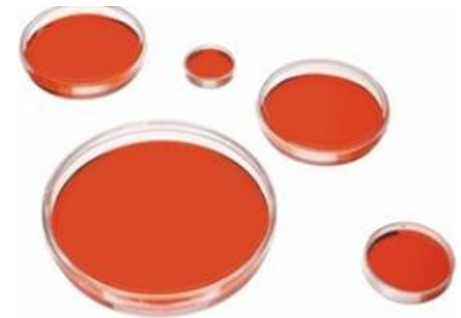


Hücre Kültür Kapları

- Plaklar
 - Plaklar, hücre kültürü için en iyi ekonomiyi ve büyüme yüzeyine erişimi sunar.
 - Yüzeyleri adherent hücrelerin tutunması için özel olarak tasarlanmıştır.

Description	Growth area (cm ²)	Recommended working volume (mL)	Cell yield*
35	8	1 - 2	0.8×10^6
60	21	4 - 5	2.1×10^6
100	55	10 - 12	5.5×10^6
150	148	28 - 32	14.8×10^6

*Cell line dependent. Based upon a density of 1×10^5 cells/cm².



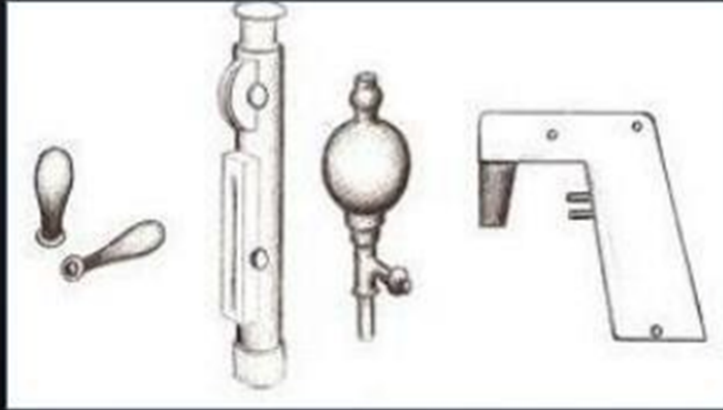
Hücre Kültür Kapları

- Kuyucuklu Plakalar
 - Kuyucuklu plakalar; tek bir plakaya kıyasla önemli ölçüde yer, medya ve ücret tasarrufu sağlar.

www.thermo.com

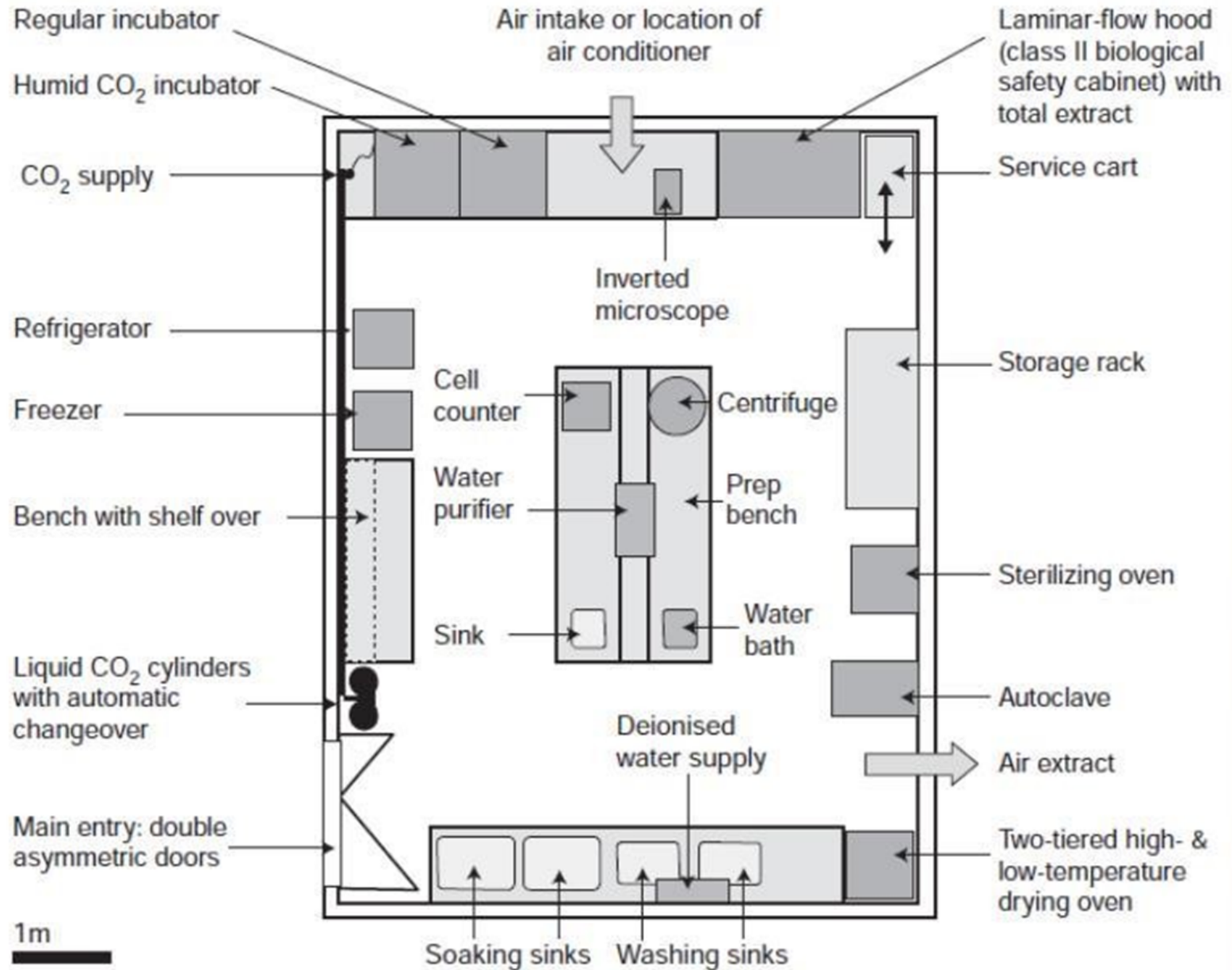


Pipette aid





İki veya üç kişi tarafından kullanılması önerilen doku kültür laboratuvarı



Orta boy doku kültürü laboratuvarı ile bitişik bir hazırlık odası ile doku kültür laboratuvarı

