
HÜCRE BİYOLOJİSİ LABORATUVARI LABORATUVAR KILAVUZU

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
BÖLÜMÜ

2024-2025 Güz Dönemi

Dersin Sorumlusu

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Doç. Dr. Ayşegül ERDEMİR

Laboratuvar Yürütücüleri

Arş. Gör. Senanur DOKUZ

Arş. Gör. Hasan Hüseyin GÜLERCAN

HAFTALIK KONULAR

Hafta	Konular	Ön Hazırlık
1	Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
2	Mikrobiyoloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler, Aseptik Teknikler ve Sterilizasyon	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
3	Mikrobiyoloji, Hücre ve Doku Kültürlerinde Kullanılan Besiyerleri	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
4	Mikroorganizma Kültürleri ve Bakteri Kültürü Hazırlama	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
5	Hücre Morfolojisi ve Boyama Yöntemleri / Gram Boyama ve Endospor Boyama Deneyleri	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
6	Antibiyotik Duyarlılık Testleri / Disk Difüzyon ve Agar Kuyucuk Yöntemi	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
7	Mikrobiyolojik Sayım Yöntemleri / Thoma Lamında Hücre Sayma ve Seri Dilüsyon Hazırlama	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
8	Ara Sınav 1	
9	Mikrobiyolojide Biyokimyasal Testler/ Ökaryot Hücre Kültürü Temel Teknikleri	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
10	Hücre Kültüründe Kontaminasyon ve Kontrol Yöntemleri / Hücre Açma ve Mikroskopik Gözlem	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
11	Hücre Sayımı, Pasajlama ve Dondurma Yöntemleri	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
12	Hücre Canlılık Testleri, Hücre Ölümü ve Apoptoz Tayini / DAPI Boyama ve Floresan Mikroskopta Görüntüleme	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
13	Hücre Doku ve Organellerinin Hazır Preparatlar ile Mikroskopik Olarak İncelenmesi	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
14	Telafi Deney Haftası	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
15	Telafi Deney Haftası	YTÜ MBG Hücre Biyolojisi Laboratuvar Föyü
16	Final	

2024-2025 Güz Yarıyılı Hücre Biyolojisi Laboratuvarı Deneyleri Not Katkı Dağılımı

Hafta	Tarih	Konular	Hazırlanacak Rapor No	Rapor notunun ders notuna katkısı
1	07.10.2024 (Grup 1-2) 10.10.2024 (Grup 3-4)	Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme		
2	14.10.2024 (Grup 1-2) 17.10.2024 (Grup 3-4)	Mikrobiyoloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler, Aseptik Teknikler ve Sterilizasyon	1	% 4
3	14.10.2024 (Grup 1-2) 17.10.2024 (Grup 3-4)	Mikrobiyoloji, Hücre ve Doku Kültürlerinde Kullanılan Besiyerleri		
4	21.10.2024 (Grup 1-2) 24.10.2024 (Grup 3-4)	Mikroorganizma Kültürleri ve Bakteri Kültürü Hazırlama	2	% 4
5		29 Ekim Cumhuriyet Bayramı sebebiyle resmi tatil		
6	04.11.2024 (Grup 1-2) 07.11.2024 (Grup 3-4)	Hücre Morfolojisi ve Boyama Yöntemleri / Gram Boyama ve Endospor Boyama Deneyleri	3	% 4
7	11.11.2024 (Grup 1-2) 14.11.2024 (Grup 3-4)	Antibiyotik Duyarlılık Testleri / Disk Difüzyon ve Agar Kuyucuk Yöntemi	4	% 4
8		Ara Sınav 1		
9	25.11.2024 (Grup 1-2) 28.11.2024 (Grup 3-4)	Mikrobiyolojik Sayım Yöntemleri / Thoma Lamında Hücre Sayma ve Seri Dilüsyon Hazırlama	5	% 4
10	02.12.2024 (Grup 1-2) 05.12.2024 (Grup 3-4)	Mikrobiyolojide Biyokimyasal Testler/ Ökaryot Hücre Kültürü Temel Teknikleri	6	% 4
11	09.12.2024 (Grup 1-2) 12.12.2024 (Grup 3-4)	Hücre Kültüründe Kontaminasyon ve Kontrol Yöntemleri / Hücre Açma ve Mikroskopik Gözlem	7	% 4
12	16.12.2024 (Grup 1-2) 19.12.2024 (Grup 3-4)	Hücre Sayımı, Pasajlama ve Dondurma Yöntemleri	8	% 4
13	23.12.2024 (Grup 1-2) 26.12.2024 (Grup 3-4)	Hücre Canlılık Testleri, Hücre Ölümü ve Apoptoz Tayini / DAPI Boyama ve Floresan Mikroskopta Görüntüleme	9	% 4
14	30.12.2024 (Grup 1-2) 02.01.2025 (Grup 3-4)	Hücre Doku ve Organellerinin Hazır Preparatlar ile Mikroskopik Olarak İncelenmesi	10	% 4
15	06.01.2024 (Grup 1-2) 09.01.2024 (Grup 3-4)	Telafi Deneyleri		



LABORATUVARDA ÇALIŞMA KURALLARI

Çalışmalarınızı etkili ve başarılı bir şekilde yürütebilmek için laboratuvarda çalışma kurallarını bilmeniz, laboratuvar araçlarını tanımanız ve onları en verimli şekilde kullanmanız, bunun için gerekli beceriyi kazanmanız gerekmektedir.

Laboratuvar çalışmalarında uyulması gereken başlıca kuralları şöyle sıralayabiliriz:

1. Laboratuvara gelmeden önce yapacağınız deneyle ilgili teorik ve pratik bilgileri okuyunuz. Böylece deney saatinin tümünü deney yapmaya ayırabilirsiniz.
2. Mutlaka laboratuvar önlüğü giyiniz. Saçlarınız uzun ise toplamalısınız.
3. Laboratuvar araçlarını kullanırken düşürmemeye ve çarpmamaya dikkat ediniz. Malzemeleri kullandıktan sonra kirli bir şekilde kurumalarına izin vermeden deterjan ile iyice yıkayınız.
4. Çalışmanın sonunda çalışma alanını temizleyiniz.
5. Kullandığınız araç-gereçleri yerlerine koyunuz.
6. Steril metod gerektiren deneylerde çalışırken bulaşmalardan sakınınız ve gerekli önlemleri alınız.
7. Bistüri ve jilet gibi kesici aletleri kullanırken dikkatli olunuz
8. Atıklarınızı kurallar doğrultusunda doğru kaplara doğru şekillerde atınız.
9. Laboratuvarda bir şey yiyip içmeyiniz ve bulundurmayınız.
10. Çalışmalardan sonra ellerinizi sabunla yıkayınız.
11. Amonyak, eter, kloroform, alkol vs. gibi zehirli ve uçucu maddeleri kullanırken kapların ağzını hemen kapatınız.
12. İçinde kimyasal bulunan kaplara yüzünüzü yaklaştırmayınız.
13. Çalışmalarınızda tutumlu olunuz, ekonomik davranınız. Kırıp dökme ve israftan kaçınınız.
14. Tehlikeli maddeleri lavaboya dökmeyiniz.
15. Bir laboratuvar defteri tutunuz. Deney sırasında yaptığınız işlemleri, elde ettiğiniz verileri bu deftere kaydediniz. Deneylerin sırasını, başlığını, amacını, gereçlerini, gözlem ve ölçmelerini, yorumunu, varılan sonuç ve genellemeleri yazınız. Gerekli durumlarda bulgularınızı çizim ve tabloya dönüştürünüz.

ÖRNEK RAPOR KAPAĞI TASARIMI

	<p>YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ MBG2131 HÜCRE BİYOLOJİSİ LABORATUVARI SONUÇ RAPORU 2024-2025 GÜZ</p>	
---	--	---

BİTKİ VE HAYVAN HÜCRELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

DENEY SORUMLUSU Öğretim Üyesi:

DENEY SORUMLUSU Araştırma Görevlisi:

RAPOR TESLİM TARİHİ:

DENEY GRUBU:

Öğrencinin Adı – Soyadı	Öğrencinin Numarası	Öğrencinin İmzası

Laboratuvar Raporu Deęerlendirme Őeması

Rapor Kısmı	Deęerlendirme Puanı
Kapak Tasarımı	5
Amaç	5
Giriş	20
Materyal-Metod	20
Deney Verileri ve Çizim	10
Sonuç ve Tartışma	30
Kaynakça	10

Dönem Sonu Not Deęerlendirme Dağılımı

Laboratuvar Raporu	% 40 (Her bir rapor %4)
Ara sınav	%20
Final	%40

1.HAFTA: Laboratuvar Tanıtımı, Güvenlik Protokolleri ve Dersin İşleyişine Yönelik Bilgilendirme

Dersin Değerlendirilme Sistemi:

Dersin değerlendirilmesinde 1 ara sınav, 1 final yapılacak ve her hafta grupça yazılan deney raporları 2. ara sınav yerine geçecektir.

1. Ara Sınav: %20
2. Ara Sınav (Haftalık deney raporlarının ortalamaları): %40

Final: %40

oranlarında yıl sonu notuna etki edecektir. Her rapor %4 oranda etki yapacaktır ve toplamda 10 rapor yazılacaktır.

Derse %80 devam zorunluluğu bulunmaktadır.

Çalışmalarınızı etkili ve başarılı bir şekilde yürütebilmek için laboratuvarında çalışma kurallarını bilmeniz, laboratuvar araçlarını tanımanız ve onları en verimli şekilde kullanmanız, bunun için gerekli beceriyi kazanmanız gerekmektedir.

Laboratuvar çalışmalarında uyulması gereken başlıca kuralları şöyle sıralayabiliriz:

16. Laboratuvara gelmeden önce yapacağınız deneyle ilgili teorik ve pratik bilgileri okuyunuz. Böylece deney saatinin tümünü deney yapmaya ayırabilirsiniz.
17. Laboratuvarında mutlaka beyaz, uzun ve temiz bir önlük giyilmeli, önlüğün önü kapalı olacak şekilde çalışılmalıdır. Saçlarınız uzun ise toplamalısınız. Çalışmayı engelleyecek ve tehlike oluşturabilecek takı ve aksesuarlar çıkarılmalıdır.
18. Laboratuvar araçlarını kullanırken düşürmemeye ve çarpmamaya dikkat ediniz. Malzemeleri kullandıktan sonra kirli bir şekilde kurumalarına izin vermeden deterjan ile iyice yıkayınız.
19. Çalışmanın sonunda çalışma alanını temizleyiniz.
20. Kullandığımız araç-gereçleri yerlerine koyunuz.
21. Steril metot gerektiren deneylerde çalışırken bulaşmalardan sakınınız ve gerekli önlemleri alınız.
22. Bistüri ve jilet gibi kesici aletleri kullanırken dikkatli olunuz. Ellerde kesik, yara vb durumlar varsa bunların üzeri güzelce kapatılıp sarılmalı veya daha sonra çalışılmalıdır.
23. Atıklarınızı kurallar doğrultusunda doğru atık kutularına atınız.
24. Laboratuvarında bir şey yiyip içmeyiniz ve bulundurmayınız. Sakız çiğnenmemeli, sigara içilmemeli, çalışırken eller yüze, göze, ağza temas ettirilmemelidir.
25. Çalışmalardan sonra ellerinizi sabunla yıkayınız.
26. Amonyak, eter, kloroform, alkol vs. gibi zehirli ve uçucu maddeleri kullanırken kapların ağzını hemen kapatınız.
27. İçinde kimyasal bulunan kaplara yüzünüzü yaklaştırmayınız.
28. Çalışmalarınızda tutumlu olunuz, ekonomik davranınız. Kırıp dökme ve israftan kaçınınız.
29. Tehlikeli maddeleri lavaboya dökmeyiniz.
30. Bir laboratuvar defteri tutunuz. Deney sırasında yaptığınız işlemleri, elde ettiğiniz verileri bu deftere kaydediniz. Deneylerin sırasını, başlığını, amacını, gereçlerini, gözlem ve ölçmelerini, yorumunu, varılan sonuç ve genellemeleri yazınız. Gerekli durumlarda bulgularınızı çizim ve tabloya dönüştürünüz.

2.HAFTA: Mikrobiyoloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler, Aseptik Teknikler ve Sterilizasyon

Mikrobiyoloji lablarında yapılan çalışmalar daima «aseptik teknikler» kullanılarak «aseptik koşullar» altında yapılmaktadır. Bunun iki sebebi vardır ;

- Laboratuvarında incelenecek olan örnek ve mikroorganizma kültürlerine istenmeyen ve incelemeyi yanıltacak diğer mikroorganizmaların bulaşmasını önlemek
- Laboratuvarında incelenecek örnekteki veya mikroorganizma kültüründeki mikroorganizmaların (özellikle patojen olabileceklerin) çevreye ve laboratuvar çalışanlarına bulaşmasını engellemek.

Mikroorganizmaların dolaylı veya dolaysız bir şekilde buldukları ortamdan canlı veya cansız bir materyal ve çevreye bulaşmasına **kontaminasyon** denilmektedir. Mikroorganizmaların canlı bir organizmaya bulaşması daha çok enfeksiyon olarak adlandırılır.

Aseptik tekniklere örnekler

-Çalışmalarda kullanılacak besiyeri, dilüsyon sıvıları, materyalin (ependorf, pipet, pipet ucu ..) uygun yöntemler ile steril edilmesi

-Bench üzerinde alev ile çalışmak (Bunzen beki alevi)

-Kültürleri veya besiyerlerini içeren kapların içerisine havada taşınan mikroorganizmaların girişini engelleyecek önlemler almak

-Ellerin, çalışma öncesinde uygun bir dezenfeksiyon malzemesi ile temizlenmesi ve çalışmaların eldiven kullanılarak gerçekleştirilmesi

-Kültürlerin biyogüvenlik kabini içerisinde açılıp kapatılması



Kullanılan cihazlar ve malzemeler



Deney tüpleri



Falkon tüp



Mikrosantrifüj (Eppendorf) tüp



Puar



Otomatik pipet



Dereceli (serolojik) pipet



Beher



Erlenmayer



Drigalski



Baget



Otoklav Şişesi



Mezür



Petri kabı



Öze



Pasteur pipeti



Pispet



Pipet uçları



Lam



Lamel



Eküvyon (Swab)



Balon joje



Hassas terazi



Manyetik karıştırıcı



Balık ve olt



Vorteks



Bek alevi



İspirto ocağı



pH Metre



Spatül



Pens



Rack



Su banyosu (benmari)



Santrifüj



İnkübatör etüv



Havan ve havan eli



Pasteur fırını



Otoklav



Biyogüvenlik kabini



Distile su cihazı



-80°C dondurucu Buzdolabı

Sterilizasyon

Sterilizasyon; bir ortamdaki bütün mikroorganizmaları «öldürme» veya ortamdan «uzaklaştırma» işlemidir. Laboratuvardaki çeşitli araç ve gereçler ile ekipmanların, besiyerlerinin ve işi bitmiş mikroorganizma kültürlerinin bilinen herhangi bir yöntem ile üzerinde veya içinde bulunan mikroorganizmaların vejetatif şekillerinin ve dayanıklı (dirençli) sporlarının öldürülmesi ya da ortamdan uzaklaştırılması işlemine denir. Sterilizasyon işlemi uygulanmış materyal sterildir.

Sterilizasyon Yöntemleri

1. FİZİKSEL YÖNTEMLER
 - a. Isıl İşlem Uygulanması
 - b. Işınlama
 - b. Mekanik Yöntemler
2. KİMYASAL YÖNTEMLER

Isıl İşlem Uygulanması

-Kuru sıcaklık uygulamalarıyla:

a. Alevden geçirmek

Bunzen beki alevi, ispiro ocağı, çakmak vb. alev sağlayan bir kaynaktan yararlanılabilir. Steril tüp, erlen, falkon gibi tüplerin ağızlarının açılıp kapatılması esnasında ayrıca steril bistüri, bıçak, pens ile sterilize edilmiş pipetler kullanılırken çevreden kaynaklanacak yüzey kontaminasyonlarından korunmak için yapılır.

Diğer yandan bistüri, bıçak, pens, drigalski, metal öze gibi araçların uçları alkole daldırıldıktan sonra alevden geçirilir ve alev çatısı altında tutularak alevin kendi halinde sönmeye beklenir. Yüzey sterilizasyonu sağlanmış olur.

b. Alevde tutmak

Öze (metal) kullanılmadan önce ve sonra alevde ucu akkor olana kadar tutulabilir.

c. Kuru sıcak havada bekletmek

Pasteur fırınında (kuru sterilizatör) boş, temiz ve sterilizasyon hazırlığı yapılmış tüp, petri kutusu, erlen, bistüri, pens gibi yüksek sıcaklığa dayanıklı malzemelerin belli sıcaklıkta (160-180°C) 1.5-2 saat tutulması ile gerçekleştirilir. Isıya duyarlı malzemelerin sterilizasyonunda kullanılmaz.

-Nemli ısı uygulamalarıyla sterilizasyon

a. Basınçlı Buhar (Otoklav)

Buharla doymuş bir ortamda, basınç altında ve 100°C nin üzerindeki ısılarla yapılan sterilizasyondur. Otoklav, çift katlı çeperi ve içindeki suyun ısıtılması için gerekli ısıtma kaynağı olan, izolasyonlu özel kapağı ile gerekli ısı, zaman ve basınç kontrol göstergeleri bulunan bir cihazdır. Otoklav; ısı ile elde edilen buharın kontrollü basınç altında kullanımını sağlar. Doymuş su buharı elde edilir, basınç altında uygun bir sıcaklığa çıkarılır ve belli bir süre bu şekilde kalmasını sağlar.

Vakumlu otoklavlarda ön vakum sistemi devreye girer ve otoklavın içerisindeki hava tamamen boşaltılır. Daha sonra buhar girişi başlar ve yaklaşık 134°C de 2 atm basınçta ortalama 3,5 dakikada sterilizasyon tamamlanır. Vakumsuz otoklavlarda, doymuş buhar ile 1 atm basınçta 121°C de 15-20 dakikada sterilizasyon tamamlanır .

Otoklavda esas olarak; besiyerleri, çözeltiler, erlen, pipet uçları, tüp, falkon, şişeler.. gibi kullanılacak olan malzemeler ve atılacak olan mikroorganizma kültürleri sterilize edilir. Genellikle bu iki tür ayrı ayrı otoklavlanır.

b. Basınçsız Buhar:

***Kaynatma**

Kaynar su banyosundan veya benmariden yararlanılır. 100°C’de 20-30 dakika tutularak gerçekleştirilir. Yüksek sıcaklıkta bozulan sıvılar ve belirli besiyerleri (enzim, aşı, serum, antibiyotik, jelatin veya şeker

içeren bazı besiyerleri) ile enjektör, enjektör iğnesi, tüp, pipet, pens ve makas gibi bazı cam ve metal malzemelerin sterilizasyonunda tercih edilir. 100°C’de kaynatma ile vejetatif hücreler ülrken sporlar ölmemektedir. Dolayısı ile kaynatma ile tam bir sterilizasyon sağlanamaz, vejetatif hücrelerin ölmesinin yeterli olduğu durumlarda kullanılabilir.

*Doymuş su buharında tutmak

Doymuş su buharı elde edilen özel kazan sistemlerinden yararlanılır. Sistemdeki su kaynatılarak elde edilir. Malzeme raf üzerine yerleştirilir ve burada belli bir süre tutulur. Bu yöntem özellikle kaynar su banyosuna daldırılmayacak özellikteki malzemeler için kullanılır.

*Tindalizasyon

Tyndal tarafından geliştirilmiş özel bir sterilizasyon yöntemidir. Hem vejetatif formları hem de spor formları öldüren bir yöntemdir. Aslında kaynatma işleminin birbirini tekrar eden 3 gün ard arda 100°C’de 20-30 dakika tutularak gerçekleştirilir. Her işlem arasında malzemeler 1 gece oda ısısında bekletilir. Kaynar su banyosundan veya 100°C’ye ayarlanmış benmariden yararlanılır.

Mekanik Yöntemler

-Filtrasyon

Sıvı örnekte (süt, içme suyu, meyve suyu gibi çözeltiler) süspansiyon halinde bulunan mikroorganizmaların belli gözenek çaplarına sahip özel filtrelerden geçirilerek ayrılması (uzaklaştırılması) işlemidir. Filtrasyon daha çok yüksek sıcaklıklara dayanıksız çözeltileri sterilize etme amacıyla kullanılır. Yüksek sıcaklık uygulamaları kan serumlarının koagülasyona, enzimlerin inaktivasyonuna, bazı antibiyotiklerde etkinliğin kaybolmasına ve bazı şekerlerde yapının bozulması ve/veya karamelizasyona neden olabilmektedir. Filtrasyon amacıyla kullanılan çeşitli tipte filtreler ve filtre düzenekleri bulunmaktadır:

*Membran filtreler

*Diatom toprağı filtreleri (Berkefeld, Mandler)

*Asbest süzgeçli filtreler (Seitz filtreleri)

*Porselen filtreleri (Chamberlend, Pasteur, Daulton)

*Cam tozlu filtreler

-Santrifügasyon

Sıvı bir örnekte (özellikle sıvı mikroorganizma kültürü vb. çözelti özelliği gösteren materyal) katı partiküller

halinde bulunan mikroorganizmaların yüksek dönme hızına sahip santrifüjlerde belli sürelerde döndürülerek

çöktürülmesi prensibine dayanır. Santrifüjleme işleme genel olarak 6000-1000 rpm’de 10-30 dakika olacak şekilde gerçekleştirilir. Santrifüjden sonra tüpün dip kısmında mikroorganizma hücrelerini içeren bir çökelti (pelet) elde edilir. Üstteki berrak sıvı (süpernatant) ise genel olarak mikroorganizma içermez.

Kimyasal Yöntemler

-Dezenfektanlar

Dezenfeksiyon, sterilizasyondan sporisid aktivitesinin olmaması ile ayrılır. Dezenfektanlardan farklı olarak endosporlara da etkili olan sterilanların kullanıma girmesiyle günümüzde dezenfeksiyon terimi, mikrobiyal kontaminasyonu minimal düzeye düşürmekten, sterilizasyona kadar uzanan geniş bir kavramı içine alır. Sorun olabilen patojen mikroorganizmalar için önerilen dezenfektanlar etki seviyelerine göre üç grupta toplanır: “yüksek, orta ve düşük seviyeli” dezenfektanlar.

Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar

Bakteri sporları hariç mikroorganizmaların tümünü 20 dakikada, 6-10 saatte bakteri sporlarını da öldürdüğünden, yüksek seviyeli dezenfektan olarak değerlendirilir.

DEZENFEKTAN	KULLANIM KONSANTRASYONU
Gluteraldehit	%2.0-3.2
Formaldehit	%6.0-8.0
Sodyum hipoklorit	100-1000 ppm serbest klor
Perasetik asit	≤ %1.0
Hidrojen peroksit	%6.0-25.0

Orta Seviyeli Dezenfektanlar

Orta seviyeli dezenfektanlar
Bakteri sporları hariç Tüberküloz basili ve diğer mikroorganizmalara yaklaşık 10 dakikada etkili dezenfektanlar

DEZENFEKTAN	KULLANIM KONSANTRASYONU
Etil veya isopropil alkol	% 60-95
Fenol ve fenol bileşikleri	% 0.4-5.0
İyodoforlar	30-50 ppm serbest iyot
Glikoprotamin	% 4.0

Düşük Seviyeli Dezenfektanlar

Vejetatif bak.lerin çoğunu, bazı mantarları ve yaklaşık 10 dk'da bazı virusları öldürebilen dezenfektanlar
Bakteri sporları ve Tbc basiline etkili değil

DEZENFEKTAN	KULLANIM KONSANTRASYONU
Etil veya isopropil alkol	< % 50
Fenol ve fenol bileşikleri	% 0.4-5.0
İyodoforlar	30-50 ppm serbest iyot
Sodyum hipoklorit	100 ppm serbest klor
Kuarterner amonyum bileşikleri	% 0.4-1.6

-Kemoterapötikler

a.Antibiyotikler

Mikroorganizma üzerindeki etki mekanizmalarına göre:

- Hücre duvarı sentez inhibitörleri (β -Laktam antibiyotikleri, glikopeptitler, fosfomisin),
- Sitoplazma membran permeabilitesini bozanlar (Polipeptit antibiyotikler),
- Protein sentez inhibitörleri (Aminoglikozitler, tetrasiklin, kloramfenikol, makrolitler, linkomisin)

b.Sentetikler (Sülfonamidler)

- Nükleik asit sentez inhibitörleri (Rifampisin, sülfonamidler)

3.HAFTA: Mikrobiyoloji, Hücre ve Doku Kültürlerinde Kullanılan Besiyerleri

Ortam, vasat, besi ortamı

Mikroorganizmaların, hücrelerin, dokuların üretilmesi, canlılıklarının devam ettirilmesi, kültürlerinin elde edilmesi, makroskopik morfolojilerinin ve biyokimyasal özelliklerinin incelenmesi, biyolojik ve metabolik ürünlerinin elde edilmesi vb. amaçlarla, onları buldukları ortam dışında üretmek/geliştirmek için kullanılan ve amaca uygun olarak genelde organizmaların gereksinim duyduğu besin öğelerini ve özellikleri içeren «besleyici ortam»lara besiyeri denir.



Besiyerlerinde Bulunması Gereken Besin Öğeleri

Karbon ve enerji kaynağı maddeler

Çeşitli karbonhidratlar (özellikle glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritler), karbonhidratların yokluğu ve yetersizliği durumlarında proteinler, amino asitler, yağlar, yağ asitleri, alkoller vb maddeler

Azot kaynağı maddeler

Proteinler, peptonlar, aminoasitler, vb. organik maddeler ile KNO_3 ve $(NH_4)_2PO_4$ gibi azotlu inorganik tuzlar

Vitaminler

Niyasin, riboflavin (B2 vitamini), tiamin (B1 vitamini), piridoksin (B6 vitamini), siyanokobalamin (B12 vitamini), folik asit, pantotenik asit, vb.

Üreme faktörleri

Çeşitli vitaminler, amino asitler, pürin ve pirimidinler vb.

İnorganik maddeler

Na, K, Cl, P, S, Ca, Mg, Fe gibi makroelementler ile Zn, Mn, Br, B, Cu, Co, Mo, V, Sr gibi iz elementler

Su

Besiyeri Hazırlanırken Kullanılan Temel Maddeler

-**Su:** Besiyeri hazırlanırken distile (saf) su ya da deiyonize su kullanılmalıdır.

-**Peptonlar:** Çeşitli proteinlerin pepsin, tripsin, papain gibi enzimlerle hidrolize edilmeleri sonucunda suda kolayca eriyebilen ve ısıtıldığında yeniden koagüle olmayan polipeptid, dipeptid ve aminoasit gibi maddelerden oluşur. Besiyerine eklenen bu maddelerin karışımı bakteriler tarafından azot kaynağı olarak kullanılır.

-**Kimyasal maddeler ve tuzlar:** Besiyerine eklenecek olan maddeler kimyasal olarak saf olmalıdır. Bu maddeler uygun çözücülerde çözülerek besiyerine eklenir.

-**Maya özütü:** Maya ekstraktı (maya özütü, yeast extract), proteolitik olarak otolize edilmiş (parçalanmış) bira mayasının (*Saccharomyces cerevisiae*) sulu ekstraksiyonu ile elde edilir. Özellikle, yüksek B kompleks vitamini konsantrasyonu sayesinde çoğu mikroorganizmanın iyi bir şekilde gelişmesini sağlar.

-Et özütü (Beef extract): Protein içermez ancak suda çözünen azotlu maddeler (aminoasitler, çeşitli peptitler) ile suda çözünen mineraller, iz elementler, üreme faktörleri (B vit., aminoasitler, pürinler) ile az miktarda karbonhidrat içerir.

-Kan: Besiyelerinin zenginleştirilmesi amacıyla tavşan, koyun veya at kanı kullanılabilir. Besiyerine eklenecek olan kanlar steril ve pıhtılaşmamış olmalıdır.

-Tampon maddeler (Buffer): Besiyeri veya çözelti içindeki ani ve hızlı Ph değişimlerini kontrol almak için kullanılırlar. Fosfatlar (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 vb.), karbonatlar (Na_2CO_3 vb.), asetatlar ve sitratlar besiyerinde en sık kullanılan tampon maddelerdir.

-Agar (Kati besiyelerinde)

Fiziksel Özelliklerine Göre Besiyerleri

Kati Besiyeri (%3-5 agar)

İçinde katılaştırıcı bir madde bulunur. «Agar»

Kati besiyerleri, agarlı besiyeridir.

Yaklaşık olarak 85–90 °C’da erir, 40–45 °C’da jelleşir.

Nutrient Agar (NA), Luria Bertani (LB) Agar, Endo Agar



Yarı kati besiyeri → (Genelde % 1-1.5 agar)

Sıvı Besiyeri

İçinde katılaştırıcı madde bulunmayan sıvı formdaki besiyerleridir.

Nutrient Broth

Luria Bertani Broth, GN Broth



Kullanım Amacına Göre Besiyerleri

Genel (Temel) besiyerleri:

Herhangi bir inhibitör madde içermeyen, besin maddelerince yeterli veya zengin, herhangi bir mikroorganizma grubunun gelişmesini özel olarak desteklemeyen, bazı zor gelişenlerin de dahil olduğu çok sayıda mikroorganizmanın gelişmesini sağlayan besiyerleridir.

Nutrient Agar ve Nutrient Broth, CASO (Tryptic Soy) Agar ve CASO (Tryptic Soy) Broth en sık kullanılan genel besiyerleri içinde yer alırlar.

Selektif (Özel) besiyerleri:

Belirli mikroorganizma veya belli bir amaç için kullanılan besiyerleridir. Selektif besiyerleri, karışık bir mikrobiyal floradan gelişmesi istenmeyenleri olabildiğince fazla baskılamak, ancak gelişmesi istenenler için -tersine olarak- minimum düzeyde olumsuz etki yapmak üzere formülize edilir. Bu amaçla genellikle çeşitli inhibitör maddeler kullanılır. Bir besiyerine selektivite kazandırılması sadece inhibitör madde ilavesi ile yapılmaz. Geliştirilmesi istenilen mikroorganizmanın kullanabileceği, ancak refakatçi mikroflora tarafından kullanılmayan besin maddeleri besiyerine karbon ve azot kaynağı olarak verilerek de selektivite sağlanabilir.

Diferansiyel (farklara dönük) besiyerleri:

Bu besiyerlerinde gelişmesi istenen mikroorganizma yanında diğer mikroorganizmalar da gelişebilir. Ancak başta koloni morfolojisi olmak üzere çeşitli farklılıklar ile hedef mikroorganizma diğerlerinden ayrılır. Bu tanımlamaya göre diferansiyel besiyerleri, zayıf ve orta güçte selektivite gösteren selektif besiyerlerinin modifikasyonu olarak nitelendirilebilir. Ayırt edici koloni özelliği, çeşitli Ph indikatörleri, boya maddeleri, indirgeyiciler, diğer indikatörler vb. maddelerin besiyerine ilavesi ile yapılır. Örneğin;

Kanlı Agar besiyeri, hemolitik ve non-hemolitik bakteri türlerinin ayırt edilebildiği için diferansiyel bir besiyeridir.

MATERYAL-METOT

***GN Broth Hazırlanması**

Cihazlar/Malzemeler:

GN Broth, Distile su, Balık, Olta, Manyetik karıştırıcı, erlen veya otoklav şişesi

Metot:

1,95 gram GN Broth tartılır. Otoklav şişesine veya behere konulur.

50 mL distile su eklenir.

İçerisine balık atılıp manyetik karıştırıcıya konulur.

Karışınca olta ile balık alınarak hazırlanan besiyeri otoklavlanmak üzere kenara alınır.

***Agar Besiyerinin Petri Kaplarına Dökülmesi**

Cihazlar/Malzemeler:

Agar besiyeri (sıcak ve sıvı formda iken), Mezür, Polistiren petri kabı, Biyogüvenlik kabini

Metot:

Biyogüvenlik kabininde çalışılır.

Otoklavlanmış agar besiyerinden mezür ile 10-15 mL ölçülür.

Besiyerinin sıcak ve sıvı formda olmasına dikkat edilir.

Steril polistiren petri kabına dökülür.

Besiyerinin donması için bekletilir.

4.HAFTA: Mikroorganizma Kùltürleri ve Bakteri Kùltürü Hazırlama

Kùltür: Üzerinde veya içinde mikroorganizma üretilmiş (veya üremiş) besiyerlerine kùltür denir.

Saf kùltür: Besiyerinde yalnızca tek bir mikroorganizma türü üretilmiş kùltürlerdir.

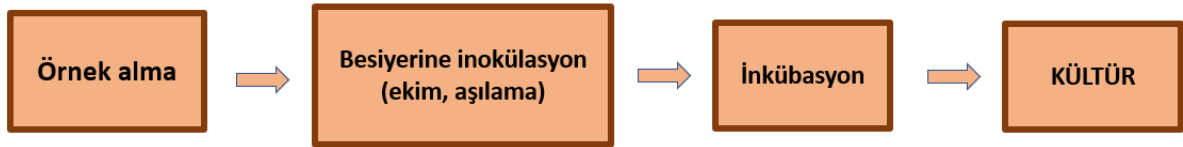
Karışık kùltür: Besiyerinde iki veya daha fazla çeşitte mikroorganizma türü üretilmiş kùltürlerdir.

Kùltür yapma (Kùltivasyon): mikroorganizmaların buldukları ortamdan belirli tekniklerle alınarak uygun bir besiyerine aktarılması ve burada gelişmelerinin sağlanması için aşamalarını içeren bir işlem serisidir.

İnokülasyon: Mikroorganizmanın besiyerine ekilmesi ya da üremesi için besiyerine bırakılması (ekilmesi) dir.

İnkübasyon: Besiyerine ekimi yapılmış mikroorganizmaları, üreyebilecekleri optimum sıcaklıkta, etüv ya da inkübatör adı verilen cihazlarda, belirli bir süre tutma işlemidir.

Kùltür elde etme aşamaları



Ön hazırlıklar:

Mikroorganizmaya uygun besiyeri seçilir. Besiyeri uygun bir yöntem ile steril edilir. Kùltürü hazırladığımız materyalin (petri, erlen, cam tüp falkon.. vs) steril edilmesi gerekir. Silinmeyecek (cam yazar) bir kalem ile kùltürün üzerine bilgileri yazılır.

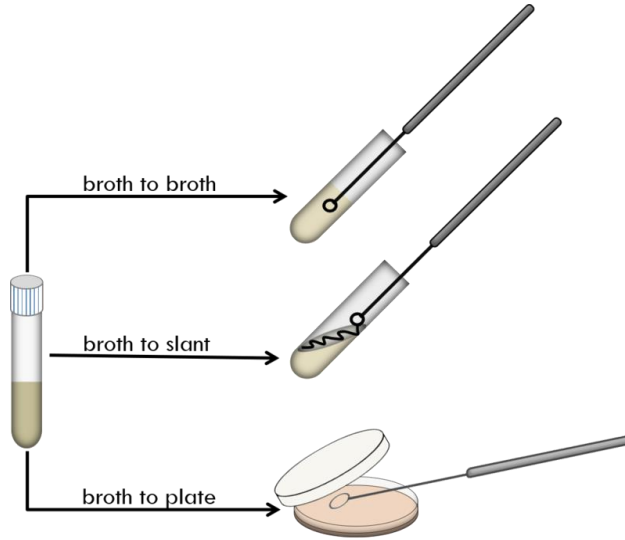
- Mikroorganizmanın adı ve/veya kodu
- Tarih
- Dilüsyon yapılmış ise oranı
- Besiyerinin adı
- İnkübasyon sıcaklığı ve süresi
- Stoğa alan kişinin ismi



Koloni: Bir bakteri hücresinin katı bir besiyerinde düştüğü herhangi bir noktada, inkübasyon süresince çok sayıda bölünmeler geçirerek oluşturduğu ve çıplak gözle görülebilen hücre topluluğudur.

Tüpteki Sıvı Besiyerinden İnokülasyon

İlk aşamada aktarılacak olan sıvı (sıvı kùltür, süt, kan.. vs) bulunduğu yerde çalkalanır (vorteks, parmak ile vurma, pipetaj gibi işlemler ile) ki mikroorganizmaların homojen dağılımı sağlansın. Sıvı örnekten aktarım yaparken tüpe öze veya mikropipet ile girilebilir. Özenin ucuna gelen veya pipet ile çekilen mikroorganizmalar başka bir sıvı besiyerine veya katı agara aktarılabilirler.



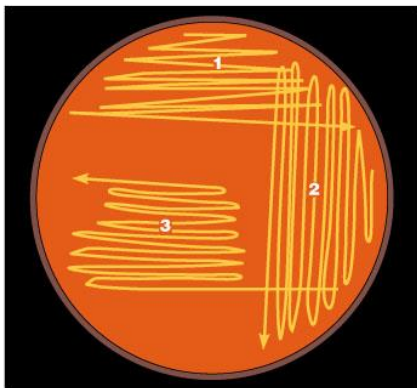
Katı Besiyerine Ekim

Sürme Yöntemi (Tek koloni düşürme tekniği)

Öze kullanılır. Özeye alınan örnek başka bir petriden alınan koloni veya sıvı besiyerinden alınan bir örnek olabilir. Sürme ilerledikçe özenin ucundaki mikroorganizma sayısı azalacağından son alanlarda tek koloniler düşürülmüş olacaktır.

Örnek özenin ucuna alındıktan sonra petri kutusu sol ele veya tezgah üzerine yerleştirilir. Öze, agar yüzüne nazikçe temas ettirilir. Sağa sola hareket ettirilerek petrinin yaklaşık yarısına kadar özenin ucundaki örnek sıkı bir şekilde dağıtılır. Bu işlem kesintisiz (öze besiyerinden kaldırılmadan) yapılır. Birinci sürme alanı elde edilmiz olur. Birinci sürme alanı sol tarafa alınacak şekilde petri kutusu 90 derece çevrilir. Öze burada değiştirilebilir veya steril edilebilir. Birinci sürme alanına değdirilip sağa doğru bir kez çekilir, öze kaldırılmadan bir kez daha birinci sürme alanına girilir ve bir daha hiç birinci sürme alanına girilmeden agar yüzeyinde sağa sola doğru hareket edilerek aşağı doğru ikinci sürme alanı oluşturulur. Petri kutusu aynı şekilde 90 derece döndürülür. Öze burada yine değiştirilebilir veya steril edilebilir. Özenin ucu ikinci sürme alanından bir kere boş agar yüzeyine doğru çekilir ve bir daha ikinci sürme alanına girilmeden boş agar yüzeyinde sağ sola hareketler ile özenin ucundaki örnek yayılır. Dilenir ise dördüncü bir sürme alanı da oluşturulabilir.

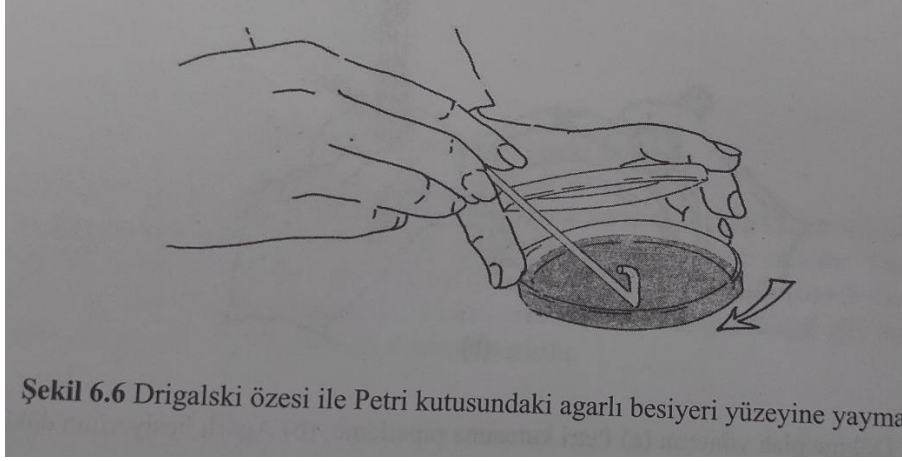
Öze, swab (eküvyon) veya drigalski kullanılarak yapılabilir.



Yüzeye Yayma Tekniği

Drigalski veya swab (eküvyon) kullanılarak yapılır. Sıvı bir örnekten alınan genellikle 0.1 mL örnek (100 mikrolitre) petri kutusunda katı agar yüzeyinde bir noktaya bırakılır. Steril bir drigalski kullanılarak besiyeri üzerine örnek yayılır. Drigalski eğer cam ise alkole daldırılarak alevden geçirilir ve

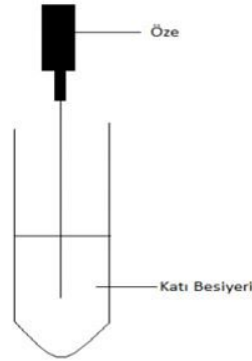
uzaklaştırılarak drigalski üzerindeki alev sönene kadar bekletirilir. Soğuyuncaya dek besiyerine sürülmez. Yayma işlemi, drigalski bir el ile tutulurken diğer elin petri kutusunu döndürmesi ve drigalskinin agar yüzeyine ileri geri hareketler ile sürülmesi ile yapılır. Çok bastırılmaz. Drigalski zor hareket edene yani örnek agar üzerinde kuruyana kadar işleme devam edilir.



Swab (eküvyon) kullanılarak yüzeye yapma yaparken, agar üzerine aktarılan sıvı örnek besiyerinin her yerine yayılacak şekilde aralıksız sürülebilir. Bir bölgeden örnek alımında da swab kullanılabilir. Mikroorganizmanın saklanması da agarlı swablar kullanılabilir.

Dik Agarlı Besiyerine Saplama Ekim

«Saplama ekim»ler dik agarlı besiyerleri kullanılarak gerçekleştirilir. Özellikle hareket muayenesi çalışmalarında kullanılır. Tüplere dağıtılan yumuşak agarlı besiyerinin sterilizasyon sonrası dik tutularak katılaşması sağlanır. Bu besiyerine, incelenecek sıvı bakteri kültüründen iğne öze ile saplama ekimi yapılır.



Batırma Ekimi

Tüpte Yatık Besiyerine Ekim

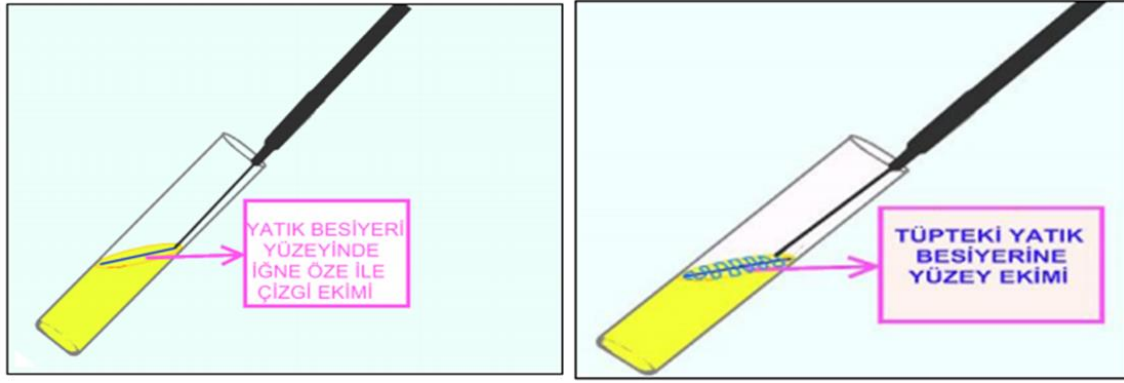
Tek koloniden örnek alınarak tüpte yatık besiyerine ekim yapmanın amacı bakterinin;

Saf kültürünü elde etmek,

Pigment oluşumunu sağlamak,

Karbonhidratlı besiyerlerinde gaz oluşturmasını sağlamak,

Bakterilerin yayılarak üremesiyle hareketlerini incelemek vb. çalışmaları yapmak amacıyla uygulanan bir ekim yöntemidir.



Şekil 2.1: Yatık besiyerine çizgi ekimi

Şekil 2.2: Tüpte yatık besiyerine yüzey ekimi

Saf Kültür Elde Etme

Saf kültürler, besiyerinde yalnızca tek bir mikroorganizma türü üretilmiş kültürlerdir. Saf kültür eldesi genellikle iki aşamada gerçekleştirilir:

- İzole kolonileri elde etmek (Petride uygun bir katı besiyerinde)
 - Belli bir izole koloniyi ayırarak, bunu ayrı bir besiyerine aktarmak (inoküle etmek)
- (Genelde önce sıvı besiyerine, daha sonra da elde edilecek sıvı kültürden katı besiyerine)

Bu amaçla ilk olarak incelenecek örnekten petri kutusundaki uygun agarlı bir besiyerine ekim yapılır, daha çok tek koloni düşürme veya yayma tekniği kullanılır. İkinci aşamada seçilen kolonilerden öze kullanılarak önce sıvı bir besiyerine canlandırma için aktarma yapılır. İnkübasyonu takiben elde edilecek kültürden uygun bir katı besiyerine tekrar aktarma yapılır ve inkübasyon gerçekleştirilir. İnkübasyon sonrası da saf kültür elde edilmiş olur.

Mikroorganizma Kültürlerinin Muhafazası

Stok kültür: Mikroorganizmanın birkaç ay veya birkaç yıl gibi uzun süreler dahilinde muhafaza edilmesi amacıyla hazırlanır. Genellikle «yatık kültür», «dik kültür» ve «liyofilize kültür» şeklinde hazırlanır.

Günlük kullanım kültürleri: Mikroorganizmaların günlük kullanımları için birkaç gün süreyle muhafaza altında tutulması amacıyla hazırlanır. Genellikle «yatık kültür», «sıvı kültür» ve «petri kutusu kültür» olarak hazırlanır.

Mikroorganizma kültürlerinin muhafaza altında tutulduğu ortamlar:

Buzdolabı (0-5°C): Yatık, dik, sıvı ve petri kültürleri genellikle buzdolabında muhafaza edilir. Genellikle hava ile teması kesmek için genelde kapakla parafilm ile sarılır.

Donma sıcaklıklarında (-20°C ve -80°C): Uzun süre muhafaza edilebilir. Sıvı kültürler muhafaza edilir. Genelde kültürler %20-30 (v/v) gliserol içerecek şekilde hazırlanır. Gliserol, buz kristallerinin oluşumunu engellediği ve hücre hasarını önlediği için bir kriyoprotektan görevi görür.

Liyofilize kültürler: Liyofilizasyon (dondurarak kurutma) işlemi ile hücreler kuru formda birkaç yıl saklanabilir.

Anaerobik Mikroorganizmaların Kültürleri

Anaerobik mikroorganizmalar: oksijen (hava) varlığında üreyip gelişemezler. Oksijen bu organizmalar üzerine toksik etki yapar.

Zorunlu anaerobik mikroorganizma: Oksijen varlığında üremeleri mümkün değil.

Aerotolerant anaerobik mikroorganizma: Ortamdaki bir kısım oksijeni tolere edebilmekte ve çok az miktarda oksijen içeren ortamlarda üreyebilmektedir.

Fakültatif anaerobik mikroorganizma: Hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda üreyebilmektedir.

Aerofilik mikroorganizma: Oksijenli ortamda üreyebilir.

Mikroaerofilik mikroorganizma: Havadakinden biraz daha az miktardaki oksijenli ortamlarda üreyebilirler.

Anaerobik mikroorganizmaların kültüründe oksijenin uzaklaştırılması gerekir. Anaerobik jar'lar özellikle zorunlu anaerobik mikroorganizmalar ile mikroaerofilik mikroorganizmaların kültürasyonlarında tercih edilir. GasPak gibi sistemler de kullanılmaktadır.

İnkübasyon

Kültür elde etme sürecindeki son aşamadır. İnkübasyon, inokülasyon (ekim, aşılama) yapılmış besiyerini içeren kabın uygun bir inkübatörde belli **sıcaklıkta** ve belli **sürede** tutulması işlemidir. İnkübasyon için genellikle «etüv» veya «su banyosu» gibi sıcaklığı ayarlanabilen «inkübatör»lerden yararlanılır.

MATERYAL-METOT

***Agar Besiyeri Üzerine Bakteri İnokülasyonu Yapılması**

Cihazlar/Malzemeler:

Agar besiyeri içeren petri, cam tüp, bakteri kültürü, sıvı besiyeri, öze, drigalski, bunzen beki, biyogüvenlik kabini

Metot:

Biyogüvenlik kabini içerisinde çalışılır.

Sıvı bakteri kültüründen otomatik pipet ile 100 uL örnek alınarak petrideki agar besiyeri üzerine konulur.

Cam drigalski önce saf etanole sokulur ardından alevden geçirilerek sterilize edilir.

Drigalskinin soğuması için beklenir.

Bakteri kültürü petriye yayılır.

VEYA

Petride geliştirilmiş olan bakteri kolonilerinden bir tanesi plastik öze ile alınır.

Katı besiyeri üzerine çizgi ekimi yapılır.

5.HAFTA: Hücre Morfolojisi ve Boyama Yöntemleri / Gram Boyama ve Endospor Boyama Deneyleri

Bakteri Morfolojisi

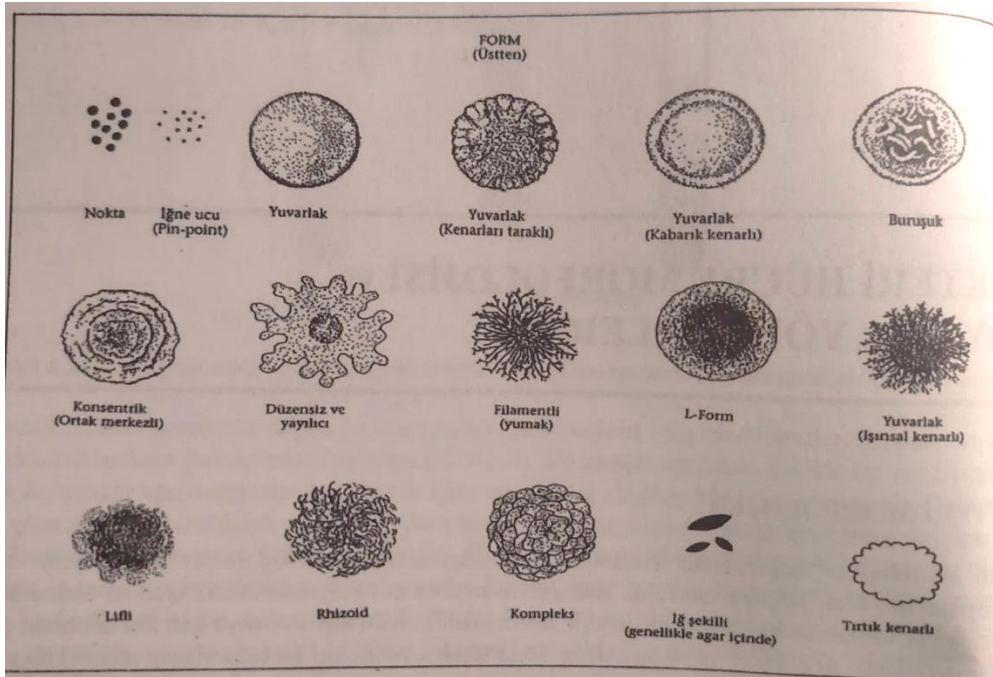
Makroskobik morfoloji: Bakterinin katı ve sıvı besiyerinde ürerken oluşturdukları, çıplak gözle gözlemlenebilen oluşumlardır.

Mikroskobik morfoloji: Bakterilerin mikroskop altında incelenirken gözlemlenen «hücre morfolojileri»dir.

Bakterilerin katı besiyerindeki makroskobik morfolojisi daha çok «koloni morfolojisi» olarak bilinir. Koloni: Bir bakteri hücrelerinin katı bir besiyerinde düştüğü herhangi bir noktada, inkübasyon süresince çok sayıda bölünmeler geçirerek oluşturduğu ve çıplak gözle görülebilen hücre topluluğudur. Bu durumda bir kolonide yalnızca belli bir bakteri türüne ait hücreler bulunur. Her bakteri belli bir besiyerinde, koşullar değiştirilmediği sürece kendine özgü karakterde koloniler oluşturur. Farklı bir besiyerine aynı bakteri ekildiğinde farklı bir koloni morfolojisi gösterebilir.

Kolonilerin petri üzerindeki değişik morfolojileri soldaki şekilde gösterilmiştir. Ancak koloniler bu özelliklerinin yanı sıra **büyüklik, renk, saydamlık, parlaklık, viskozite, kuruluk, çözünürlük durumu ve koku** yönleriyle de incelenmektedir. Kenar özelliklerine göre bakteriler genel olarak S-koloni ve R-koloni olarak ikiye ayrılabilir S-koloniler kenarları düz (smooth), R-koloniler kenarları dalgalı (rough) olanlardır.

Sıvı besiyerinde incelendiğinde ise gelişme durumlarına göre değişiklik gösterebilirler. Çoğunlukla bulanık, yüzeyde zar ve dipte tortu oluşturma şeklinde makroskobik özellikler sergilerler.



Bakterilerde Mikroskobik Morfoloji

Bakteriler mikroskop altında incelenirken gözlemlenen hücre morfolojilerinde; şekil ve büyük, diziliş düzeni, sahip olduğu spor gibi hücresel yapıları ve boyama özellikleri dikkate alınır.

Bakteri Hücre Şekilleri

Kok: Yuvarlak şekillidirler.

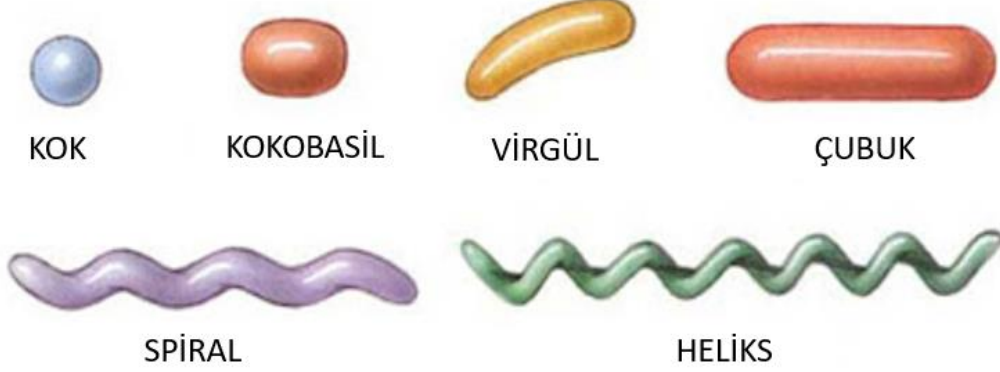
Çubuk-çomak-: Bu hücre şekline «basil» denir. Çubuk şekillidirler.

Bazı çubuk şekilli bakterilerin enleri boylarına yakındır ve mikroskop altında yanılığa düşülebilir. Bu özellikteki çubuk şekilli bakterilere «**kokobasil**» denir.

Kıvrık (virgül) şekilli bakteriler virgüle benzerdirler. Vibrio veya Comma adı da verilir.

Spiral şekilli bakteriler.

Heliks şekilli bakterilere «**spiroketler**» adı da verilir.



Bakterilerin Hücre Düzenleri

Kok Şekillilerin Hücre Düzeni:

Monokok: Tek tek görünürler.

Diplokok: İkili ikili görünürler.

Streptokok: Zincir gibi görünürler.

Stafilokok: Üzüm salkımı gibi görünürler.

Tetrat: Dört hücre bir kare oluşturur şekilde bir araya gelir.

Sarsina: Hücreler paket görünümü gibi bir araya gelir.

Çubuk Şekillilerin Hücre Düzeni:

Tek çubuklar: Tek tek görünürler.

Diplobasil: İkili ikili görünürler.

Streptobasiller: Zincir gibi görünürler.

Difteroid basiller (palisades –çit-): Hücreler birbirine paralel olacak şekilde çit gibi bir araya gelir. Bu bakteri grubuna difteroid veya koryneform grubu bakteri denir.

Kıvrık, spiral ve heliks şekilli bakteriler genelde dağınık ve tek tek görünürler.

Bakterileri Boyama Yöntemleri

Bakteriler genel olarak saydamdır bu nedenle boyayarak incelemek bakterileri tanımlamada iyi bir yöntemdir. Bakteriler boyalara ve boyama yöntemlerine karşı gösterdikleri davranışlara göre «Gram negatif», «Gram pozitif», «aside dirençli» bakteriler gibi gruplara ayrılabilirler.

Boyalarda:

Boya, bir benzen halkasına (C₆H₆) bağlı «**kromofor**» ve «**oksokrom**» grupları taşıyan organik bir bileşik olarak tanımlanabilir. Benzen halkasındaki H atomları yerine farklı element veya grupların gelmesiyle değişik boyalar oluşur.

Kromofor grubu boya molekülüne renk özelliğini verir. Oksokrom grubu boyaya elektrolitik çözünme özelliği veren tuz kısmıdır, boyanın asidik mi bazik mi olduğunu belirler. Tuz oluşturup bağlanmayı sağlar. Boyalar, boya molekülünün elektrik yüküne göre asidik, bazik ve nötr boyalar olarak ayrılabilirler.

Bazik Boyalar: Pozitif, katyonik olarak bulunurlar. NH₂⁺, (CH₃)₂⁺ oksokrom gruplarını içerirler.

Metilen mavisi, Kristal violet, Bazik fuksin, Safranin ..vb.

Asidik Boyalar: Negatif, anyonik olarak bulunurlar. OH^- , SO_3H^- ve COOH^- gibi oksokrom gruplarını içermektedirler.

Asit fuksin, Çini mürekkebi, Nigrosin, Malaşit yeşili ..vb.

Nötr Boyalar: İyonik değildir. Asidik ve bazik boyaların uygun oranda karışımından elde edilir.

Giemsa, Wright, Leishman..vb.

Doğal boyalar: Yukarıda belirtilen sentetik boyalara göre daha az kullanılırlar. İndigo, karmin, litmus, orsein ..vb.

Mordant: Boyanacak madde ile boyanın birleşmesini kolaylaştıran veya kuvvetlendiren maddelerdir.

Basit Boyama Yöntemi

Tek bir boya kullanılır. Metilen mavisi, kristal violet, sulu fuksin, safranin gibi boyalar kullanılabilir. Bakteriler, boyamada kullanılan boyanın rengini alırlar.

İzlenebilecek yol:

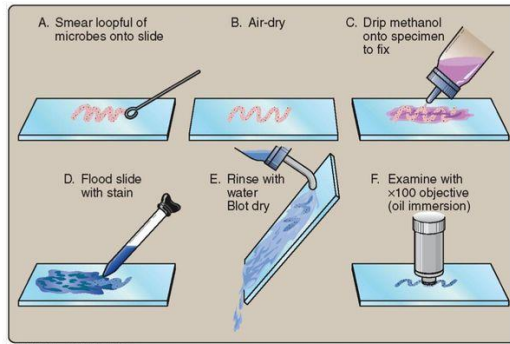
-Preparat hazırlanır.

-Preparatın üzeri kullanılacak boya çözeltisiyle kaplanarak 1 dk beklenir.

-Boya dökülerek, preparat damıtık su ile yıkanır.

-Kurutulan preparat mikroskopta incelenir.

Basit Boyama



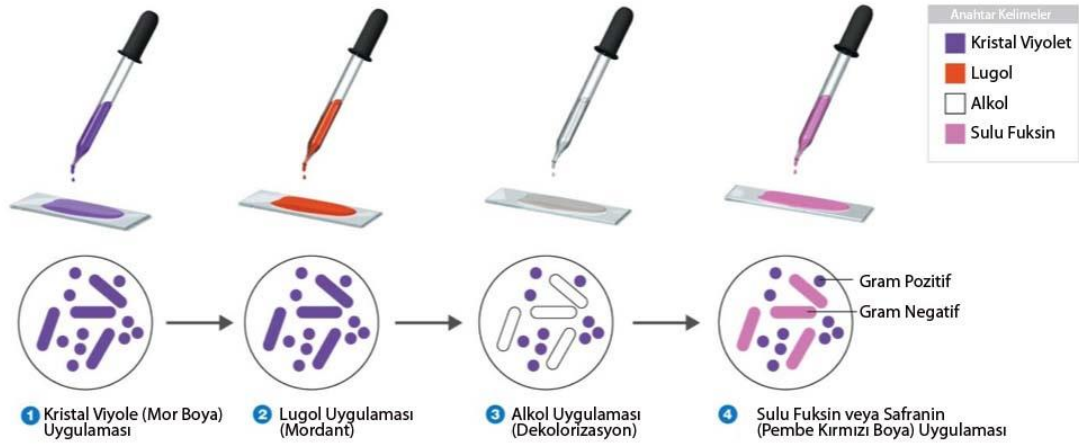
1. İlk olarak fiksasyon işlemi yapılır.
2. Sonra bir çeşit boya eklenir.
3. İnkübasyon süresinin ardından boyanın fazlası yıkanır.
4. İnceleme yapılır.

Diferansiyel Boyama

İki farklı renkte boyanın aynı preparat üzerine belli tekniklerle ve ard arda uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Hücreler birinci boya ile bu boyanın rengini alırlar. Bunun ardından genelde preparata bir «renk giderici (çoğunlukla etil alkol)» uygulanır. **Renk giderme : dekolorizasyon**

Gram boyama, bir diferansiyel boyama tekniğidir. Gram boyama özelliklerine göre bakteriler Gram negatif ve Gram pozitif olarak ikiye ayrılırlar. Gram boyama işleminde ve diğer diferansiyel boyamalarda bakterilerin birbirinden ayırt edilmesinde dekolorizasyon özelliklerindeki farklardan yararlanılır. Gram negatif bakteriler daha kolay dekolorize olur. Dekolorizasyon işleminden sonra ikinci boya preparata damlatılır, buna karşıt boya denir. Dekolorize olmuş hücreler bu sefer karşıt boya renginde boyanırlar.

Gram boyama sonucunda Gram pozitif bakteriler mor, Gram negatif bakteriler pembe-kırmızı gözüktürler. Gram boyama, Ziehl-Neelsen boyama, spor boyama, flagella boyama, kapsül boyama, yağ boyama teknikleri diferansiyel boyama tekniklerindedir.



Negatif Boyama

Hücreler boyanmaz, hücrelerin yayıldığı preparat ortamı (lam) boyanır. Boyama için çini mürekkebi veya nigrosin boya çözeltisi kullanılır. Bu yöntem genellikle bakterilerde kapsül varlığını ortaya çıkartmada kullanılır.

Gram Boyama

Diferansiyel boyama yöntemidir. 1884 yılında Christian Gram tarafından geliştirilmiştir. Teknik sayesinde bakteriler Gram pozitif ve Gram negatif olarak ikiye ayrılmıştır. Ancak bazı bakteriler Gram boyama yöntemi ile boyanamaz. Örneğin *Mycobacterium* cinsi bakteriler Ziehl-Neelsen yöntemi ile boyanırlar.

İzlenebilecek yol:

Preparat hazırlanır: Lam, temiz bir bez ile silinir. Sıvı kültürden analiz yapılacak ise öze ile kültüre girilir ve alınan örnek preparat üzerine bir noktaya ince bir film halinde sürülür. Örneğin sürüldüğü yerin arka kısmı alevden 2-3 kere hızlıca geçirilir. Bakterilerin lam üzerine tespiti (fiksasyon) yapılmış olur. Bu işlem bakterilerin lam üzerine yapışmasını ve yıkamada akıp gitmemesini sağlar.

Bakterilerin üzerine **kristal violet** damlatılır. 1 dakika beklenir.

Boyayı akıtmak için preparat akan su ile yıkanır.

Örnek üzerine **lugol** (Gram iyot çözeltisi) damlatılır. 1 dakika beklenir. Lugol burada mordant olarak işlev görür.

Preparat akan su ile yıkanır.

Örnek üzerine %96'lık etil alkol damlatılır ve 10-15 saniye beklenir. «dekolorizasyon»

Preparat akan su ile yıkanır.

Örnek üzerine karşıt boya olarak sulu fuksin veya safranin damlatılır. 30 -60 saniye bekletilir.

Preparat akan su ile yıkanır.

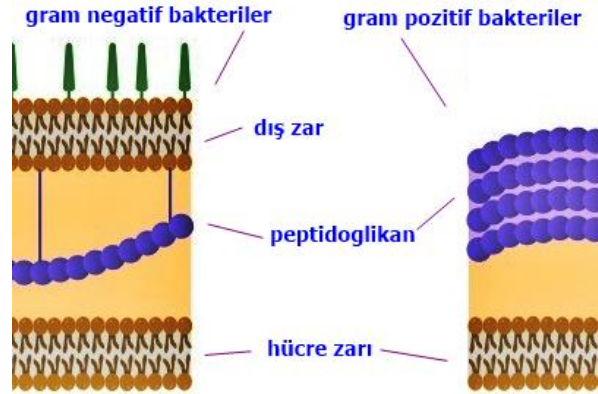
Mikroskop ile incelenir.

Gram Boyama Mekanizması

Bakterilerin Gram pozitif ve Gram negatif olarak ayrılması, onların «hücre duvarları»ndaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Kristal violet'i hücre içinde tutabilenler Gram pozitif, tutamayanlar Gram negatif bakterilerdir.

Gram boyama sırasında lügol ile muameleden sonra bakteri hücresi içinde «kristal violet-iyot kompleksi» meydana gelmektedir. Gram pozitif bakteriler, alkol ile dekolorizasyon sonrası bu kompleksi hücre dışına atamazlar. Bu sebeple mor renkli gözüktürler. Gram negatif bakterilerde hücre duvarında yağ oranı yüksek olduğundan, alkol hücre çeperindeki yağı belli bir miktarda çözerek hücre

duvarında boşluklar meydana gelmesini sağlar. Kristal violet ise bu boşluklardan dışarı çıkar. Bu aşamadan sonra bakteriler karşıt bir boya olan sulu fuksin ile boyandıklarında renkleri pembe-kırmızı olur.



Endospor Boyama

Bakteri Sporları

Bazı bakteriler belirli koşullarda, hücre içerisinde dış etkenlere karşı daha dirençli olan ve «endospor» olarak isimlendirilen özel yapılar oluştururlar. Endospor oluşumundan sonra bakteri ölebilir veya lize olup dağılır. Bu durumda endosporlar serbest hale geçerler. Bunlara serbest spor veya sadece spor denir.

Sporlar, çevreye yayılarak uzun süre (yıllarca) dormant halde (uyku halinde) canlılığını sürdürebilmektedir. Koşullar uygun olduğunda (uygun sıcaklık, nem, besin ortamı) çimlenerek tekrar yeni birer bakteri hücresi haline dönüşebilmektedir. Bu bir bakteri üreme şekli değildir!

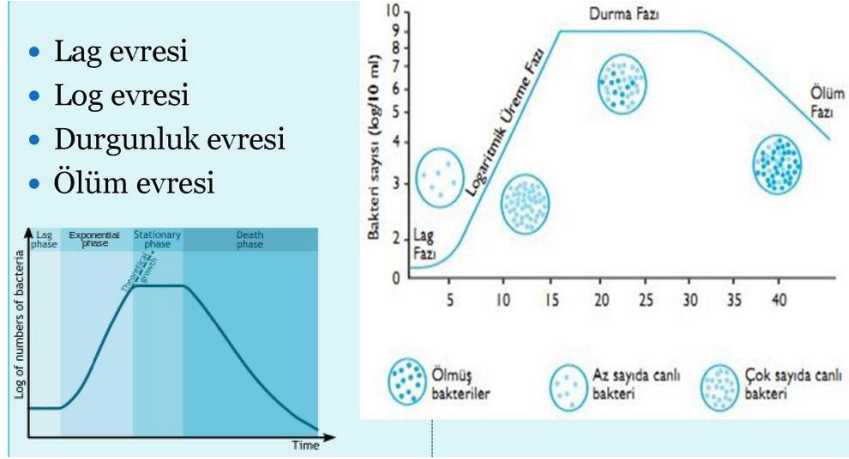
Çünkü bakteriler ikiye bölünerek çoğalırlar. Buna göre de endosporlar, bu tip bakterilerin neslini devam ettirme çabasıyla kaynaklanan genetik bir özellik veya form olarak kabul edilebilirler.



Spor oluşumu Bacillaceae ailesinin tipik bir özelliğidir. Spor oluşumu bu familyanın üyeleri olan *Bacillus*, *Clostridium* ve *Desulfotomaculum* cinsi bakterilerde görülür. Bunlar çubuk şekilli (basil) bakterilerdir.

Kok, virgül, spiral, heliks şekilli bakteriler spor oluşturma yeteneğine sahip değildirler (İstisna: *Sporolactobacillus* ve *Sporosarcina*).

Sporlu bakteriler endosporlarını üremelerinin erken evrelerinde yapmazlar. Endospor oluşumu logaritmik üremenin bitiminde başlar.



Sporlu bir bakteri, belli koşullarda, hücre içinde kendine özgü konumda, biçimde ve büyüklükte endospor oluşturmaktadır. Şekilde bakteri endosporlarının hücre içindeki farklı konumları ve bunların isimleri gösterilmiştir. Endospor bulundurmayan bakteri hücrelerine "vejetatif hücre", endospor oluşmuş hücrede endosporu çevreleyen hücre kısmına "sporangium" adı verilmektedir. Serbest sporlar çok hafiftirler ve hava akımıyla toz partiküllerine tutunarak hemen her yere rahatlıkla taşınabilmektedirler. Bu nedenle de, sporlar önlem alınmadığı takdirde besiyeri ve kültürlerle önemli bir kontaminasyon kaynağı haline gelmektedir.

Bakteri Sporlarının 3 Önemli Özelliği

- Kimyasal maddelere karşı geçirgenizlik
- Sıcaklığa dayanıklılık
- Kırılma indisinde artma

Endosporların Mikroskopik İncelenmesi

Bakteri sporları özel «spor boyama» yöntemleriyle boyanarak mikroskopta gözlenebilir hale gelmektedir. Ancak bakteri sporları «basit boyama» veya «Gram boyama» uygulamasını takiben de mikroskopik olarak gözlenebilir hale gelebilmektedirler. Spor boyama yöntemleri, sporların kimyasal maddelere karşı geçirmezlik özelliğinin yüksek sıcaklık (kaynar su sıcaklığı gibi) uygulamalarıyla bozulması prensibinden hareketle geliştirilmiştir. Basit boyama veya Gram boyama sonrasında sporların gözlemlenebilir hale geçmesi ise, sporların kimyasal maddelere (boyama esnasında kullanılan boyalara) karşı geçirmezlik özelliğinden kaynaklanmaktadır.

MATERYAL-METOT

*Gram Boyama

Cihazlar/Malzemeler:

Staphylococcus aureus ve *Escherichia coli* bakteri kültürleri, lam, lamel, kristal viyole, lügol, etil alkol, sulu fuksin, Pasteur pipeti, öze, ışık mikroskobu

Metot:

Lam, etanol ile temizlenir.

E. coli ve *S. aureus* bakteri kültürlerinden 2 mikrolitre alınır ve lamın iki tarafına damlatılır. Öze ile ince bir film oluşturacak şekilde kültürler yayılırlar (birbirlerinden uzak olmalı).

Lamın alt kısmı alevden 2-3 kere hızlıca geçirilir.

Pasteur pipeti ile **kristal violet** bakterilerin üzerine 1 damla damlatılır. 1 dakika bekletilir.

Boyayı akıtmak için preparat akan su ile yıkanır.

Bakterilerin üzerine **lugol** (Gram iyot çözeltisi) 1 damla damlatılır. 1 dakika beklenir. Preparat akan su ile yıkanır.

Bakterilerin üzerine %96'lık **etil alkol** damlatılır ve 10-15 saniye beklenir. «dekolorizasyon»

Preparat akan su ile yıkanır.

Bakterilerin üzerine karşıt boya olarak **sulu fuksin** veya **safranin** damlatılır.

30 -60 saniye bekletilir.

Preparat akan su ile yıkanır.

Mikroskop ile incelenir.

***Endospor Boyama**

Cihazlar/Malzemeler:

Bacillus subtilis bakteri kültürü, lam, lamel, metilen mavisi, Pasteur pipeti, öze, ışık mikroskobu

Metot:

Basit boyama ile sporların incelenmesi amaçlanmaktadır.

Kullanılacak boya → Metilen Mavisi

Lama bir damla bakteri kültüründen (*Bacillus subtilis*) damlatılır.

Laman alt kısmı 2-3 kez alevden geçirilir.

Kuruduktan sonra 1 damla Metilen Mavisi damlatılır.

1 dakika beklenir. Lam su ile yıkanır.

Kuruduktan sonra mikroskop ile inceleme yapılır.

6. HAFTA: Antibiyotik Duyarlılık Testleri / Disk Difüzyon ve Agar Kuyucuk Yöntemi

Antimikrobiyal Maddeler (AMM)

Mikroorganizmaları öldüren (mikrobisid etki) veya onların üremesini/gelişimini engelleyen (mikrobiyostatik) maddelerdir. Dezenfektanlar, antiseptikler, antibiyotikler, inhibitör etkili diğer bazı maddeler..vs bu gruba girmektedirler.

Dezenfektanlar: hipokloritler, kloraminler, iyodoforlar, kuaterner amonyum bileşikleri, amfoterik bileşikler, oksidan maddeler (hidrojen peroksit, parasetik asit, ozon..), alkaliler (sodyum hidroksit; kostik, potasyum hidroksit..), asitler (HCl, asetik asit, benzoik asit..), alkoller, aldehitler, fenol ve türevleri, sabunlar, ağır metal iyonları ve tuzları gibi

Antibiyotik: penisilin, streptomisin, tetrasiklinler, sülfonamidler, aminoglikozidler .. Gibi

İnhibitör etkili mikrobiyostatik bazı boyalar: Metilen mavisi, kristal viyole gibi..

Bazı gıda katkı maddeleri: Sodyum klorür, sodyum nitrit, nisin gibi..

Antimikrobiyal Maddelerin Etkinliğini Etkileyen Faktörler

AMM'lerden temizlik, dezenfeksiyon ve antisepsi yaratma amacıyla veya enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ilaç (antibiyotik) olarak ya da gıdalarda «koruyucu katkı maddesi» olarak yararlanılmaktadır. AMM'lerin etkinliği birçok faktörden etkilenebilmektedir. Bu etkiler iki şekilde gruplanabilir:

AMM ve uygulanışa ait faktörler:

AMM'nin kimyasal özelliği
AMM'nin konsantrasyonu
Uygulama sıcaklığı
Uygulama süresi
pH
Ortamdaki diğer kalıntılar

Mikroorganizmalara ait faktörler:

Mikroorganizmanın karakteri
Mikroorganizma yaşı
Canlı mikroorganizma sayısı
Mikroorganizma çeşidi

Antimikrobiyal Madde Etkinliği Test Yöntemleri

Spesifik ve duyarlı test mikroorganizmasının seçimi ve kullanımı bu testlerin ilk ve en önemli basamağıdır. AMM'nin belli bir mikroorganizma üzerinde etkisi «minimal inhibitör konsantrasyon (MİK)» veya «minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK)» şeklinde belirlenebildiği gibi, söz konusu herhangi bir mikroorganizma suşunun belli bir AMM'ye karşı duyarlılığı da ortaya konulabilir. Diğer taraftan bu testlerden yararlanılarak herhangi bir ortamdaki (yüzey, gıda..) AMM varlığı da nitel ya da nicel olarak ortaya konulabilmektedir.

Tüp Dilüsyon Yöntemi

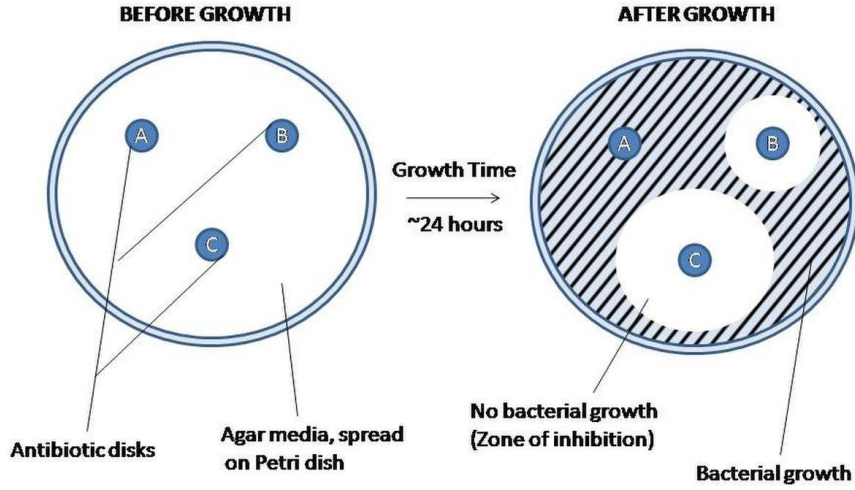
Yöntem daha çok AMM'nin MİK ve/veya MBK değerlerinin belirlenmeye çalışılmasında kullanılır. MİK değeri; denenen test mikroorganizma kültüründe, test koşullarında üremeyi (mevcut canlı hücre sayısının artışı) inhibe eden (engelleyen) en düşük AMM konsantrasyonudur.

Agar Difüzyon Yöntemleri

Pek çok AMM'nin etkinliği «agar difüzyon» yöntemi ile kolay ve kısa sürede ortaya konulabilmektedir. Bu yöntemden yararlanılarak test edilecek mikroorganizmanın AMM'lere duyarlılığının yanı sıra herhangi bir ortamdaki bir AMM'nin varlığı da belirlenebilmektedir.

Yöntem; uygun şekilde ekimi yapılmış test mikroorganizması bulunan bir petri kutusundaki agarlı besiyerine uygun şekilde eklenen AMM'nin besiyerine difüze olması ve difüze olduğu alanda mikroorganizmanın gelişimini engelleyip engellemediğinin belirlenmesi prensibine dayanır.

Eğer AMM test mikroorganizması üzerinde etkiliyse; AMM'nin eklendiği yerin çevresinde inkübasyon sonrasında mikroorganizma gelişiminin olmadığı bir «**inhibisyon zonu**» oluşur. En yaygın uygulanma şekilleri «**kağıt disk agar difüzyon/disk difüzyon**» ve «**delik agar disk difüzyon/agar kuyucuk difüzyon**».



MATERYAL-METOT

*Disk Difüzyon Yöntemi

Cihazlar/Malzemeler:

Antibiyotik diski, antibiyotik solüsyonu, agar petri, sıvı bakteri kültürü, drigalski

Metot:

Antibiyotik stoğundan 1 mL hacminde ½'lik dilüsyonlar hazırlanıp (3 dilüsyon) MİK değeri belirlenmesi için test (broth mikro dilüsyon) yapılacak:

Stok: 1 mg/mL ampisilin

Dilüsyonlar: 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL ampisilin

96 kuyucuklu plate ile çalışılacak. Her kuyuya 0.1 mL (100 µl) bakteri kültürü eklenecek. Üzerine 0.1 mL (100 µl) dilüsyon örneği eklenecek. 37°C'de 1 gece inkübe edilecek.

*Agar Kuyucuk Difüzyon

Cihazlar/Malzemeler:

Antimikrobiyal etkinliği test edilmek istenen örnekler (öğrenciler tarafından getirilecek), agar petri, sıvı bakteri kültürü, drigalski

Metot:

Agar besiyerine antimikrobiyal testi yapılacak örnek sayısınca kuyu açılacak. Her kuyuya 50 µl örnek eklenecek. 37°C'de 1 gece inkübe edilecek.

Not: Bu deney için antimikrobiyal aktivitesine bakılmak istenen herhangi bir numune kullanılabilir (antibiyotik, deterjan, alkol vs..).

7.HAFTA: Mikrobiyolojik Sayım Yöntemleri / Thoma Lamında Hücre Sayma ve Seri Dilüsyon Hazırlama

Mikrobiyolojik Sayım ve Önemi

İncelenmekte olan örnekte hangi çeşit, grup, cins veya türde mikroorganizma olduğunun bilinmesi yani mikroorganizmaların örnekten izole edilmesi ve tanımlanması önemlidir. Bunun yanı sıra incelenen örneğe ait bazı mikrobiyolojik problemlerin çözümünde, deneylerin tasarımında örnekteki mikroorganizmaların sayısını bilmek de önemlidir.

Sayım sonuçları incelenen örneğin katı veya sıvı ortamda olmasına göre genel olarak sayı/mL, sayı/g veya sayı/cm³ olarak verilmektedir. Katı besiyerinde koloni sayımına dönük sayım yöntemlerinde sonuçlar genelde CFU/ml ile ifade edilir. **CFU: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim: KOB)**

Sayım yöntemleri 2'ye ayrılabilir:

«**Direkt sayım yöntemleri**» direkt olarak mikroorganizma hücrelerinin veya kolonilerinin sayıldığı yöntemlerdir.

«**İndirekt sayım yöntemleri**» mikroorganizma sayılarının; mikroorganizmaların belirli bazı hücresel özellikleri (hücrelerin kimyasal kompozisyonu vb.), metabolik faaliyetleri (kültür ortamında asitlik artışı gibi) ve besiyerinde oluşturduğu değişiklikler (sıvı besiyerinde bulanıklık derecesinde artış, Durham tüpünde gaz oluşumu vb.) gibi durumları dikkate alınarak dolaylı bir şekilde belirlenmesine ya da tahmin edilmesine yönelik yöntemlerdir.

Kültürel Sayım Yöntemleri

Bu yöntemlerde katı besiyeri kullanılır ve inkübasyonu takiben besiyerinde gelişen mikroorganizma kolonileri sayılır. Bu sebeple kültürel sayım yöntemleri **koloni sayımı** olarak da bilinir. Yalnızca canlı mikroorganizmalar sayılmış olur.

1. **Örneklerin ekime hazırlanması**
2. **Seri dilüsyonların hazırlanması**
3. **Uygun agara ekim**
4. **İnkübasyon**

Örneklerin Ekim için Hazırlanması

Örnek homojenizasyonu işlemidir.

Sıvı örneklerin hazırlanması: Örneği bulunduğu tüp, şişe..vb iyice karıştırılmalıdır. Karıştırılmış örnekten bir miktar pipet ile alınarak uygun steril bir sıvıya (su, besiyeri..vs) aktarılabilir böylece ilk dilüsyon da hazırlanmış olur.

Katı veya yarı katı örneklerin hazırlanması: Örnekler, steril araç-gereçler kullanılarak küçük parçalara ayrılabilir veya ezilebilir, ufalanıp toz haline getirilebilir. Sonra belli bir miktar tartılarak uygun steril bir sıvıya (su, besiyeri..vs) aktarılır. Örnek ile aktarılan sıvının homojen karışması için karıştırılabilir.

Örneklerin Seri Dilüsyonlarının Hazırlanması

Kültürel sayım yapılacak örneğin mL'inde veya gramında binlerce hatta milyonlarca mikroorganizma olabilir. Bu sebeple dilüsyonlar hazırlanıp ekim yapılması, sayım yapılmasının sağlanması açısından önemlidir.

Dilüsyon hazırlama: mikrobiyolojik yönden incelemeye alınacak olan orijinal örnek içindeki mikroorganizma sayısının belli oranlarda sulandırılarak (dilüe edilerek) daha aza indirmeyi amaçlayan işlemdir.

Dilüsyon sıvıları: serum fizyolojik, damıtık su, fosfat tampon (pbs), besiyeri.. →steril olmalı.

Dilüsyon serileri farklı oranlarda hazırlanabilir.

Desimal (ondalıklı) dilüsyon serileri:

1/10 (10^{-1}), 1/100 (10^{-2}), 1/1000 (10^{-3}), 1/10.000 (10^{-4})....

İki katlı dilüsyon serileri:

½, ¼, 1/8, 1/16, 1/32...

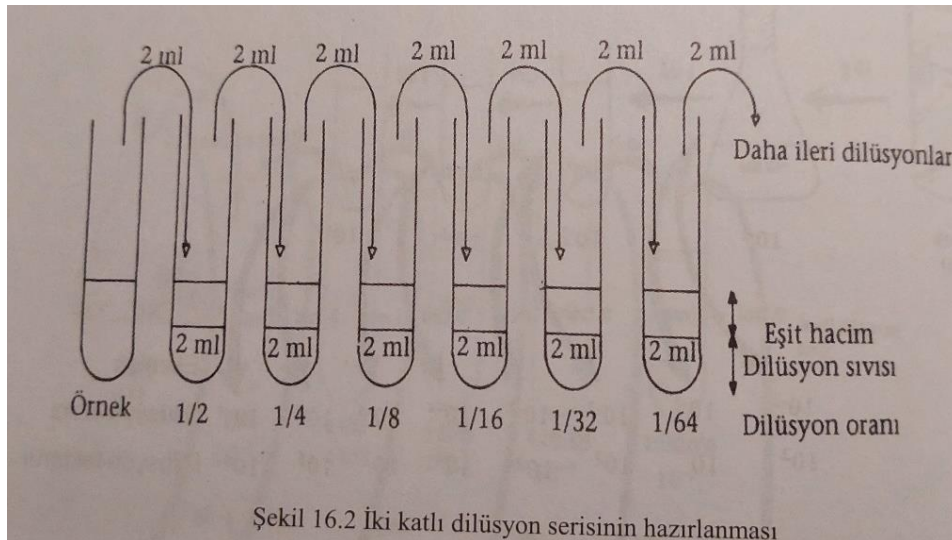
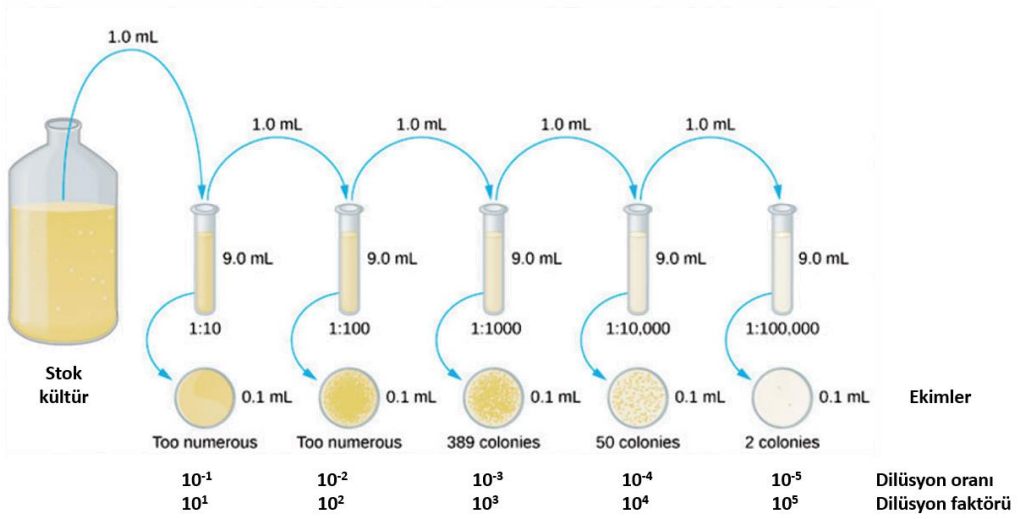
Dört katlı dilüsyon serileri:

¼, 1/16, 1/64, 1/256...

Koloni sayısı x dilüsyon faktörü= Ana stoktaki canlı bakteri sayısı (cfu/ml)

En son tüpten 0.1 mL örnek alınıp ekim yapıldığında, stok kültürden 1/100.000 oranda daha az koloni oluşacaktır. Bu da sayılabilir olduğundan ana stoktaki veya her dilüsyon sıvısındaki bakteri sayısı belirlenebilecektir.

Desimal (ondalıklı) dilüsyon serileri:



Sayım Sonuçlarının Hesaplanması

Örnek	Dilüsyon			
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
1. Deneme	286	29	3	1
2. Deneme	246	25	3	0
Ortalama	266	27	3	<1

Canlı aerobik bakteri sayısı: 266x10⁶ CFU/mL

Genelde virgülden sonra iki basamak ve bir tam sayı olacak şekilde yazılır.

Canlı aerobik bakteri sayısı: 2.66x10⁸ CFU/mL

Direkt Mikroskopik Sayım Yöntemleri

Direkt mikroskopik sayımda genelde bu amaca göre üretilmiş özel lamlar kullanılır (Thoma, Howard, Malessez, Neubauer gibi). Sayım yapılacak sıvı örnek lamların üzerine usulüne uygun olarak yayılır ve daha sonra ya direkt olarak ya da boyama yapılarak mikroskopta hücre sayımına geçilir.

Basit, hızlı bir yöntemdir. Hem canlı hem ölü hücrelerin sayımında kullanılır.

Thoma Lamı ile Direkt Mikroskopik Sayım

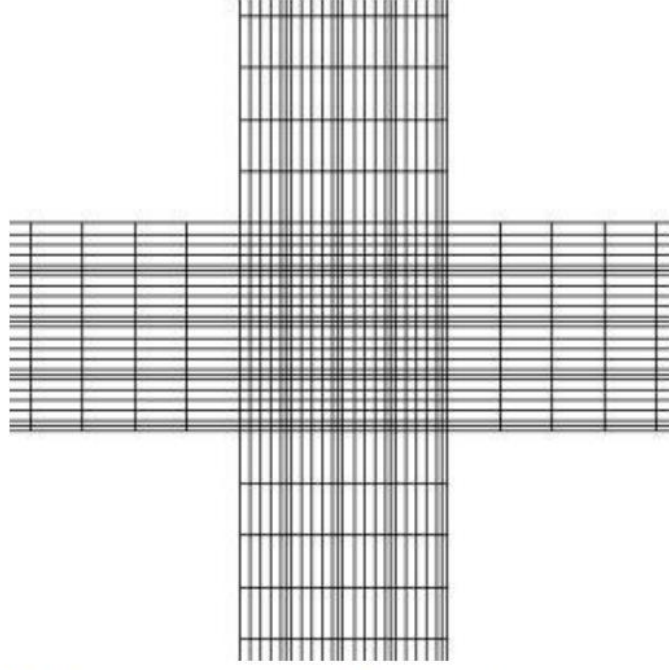
Sayım sonucu (sayı/mL)= Toplam hücre (veya spor) x 10⁴ x dilüsyon faktörü

Bu direkt mikroskopik sayım yönteminde "Thoma lamı" adı verilen özel lam'lar kullanılır. Thoma lamı mikrobiyolojide daha çok maya hücrelerinin sayımında kullanılmaktadır. Thoma lamıyla "mikroorganizma spor sayımı" da gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle küf sporlarını bu yolla saymak mümkün olabilmektedir. Bu yolla bakteri sayımı oldukça güç olup önerilen bir yöntem değildir. Thoma lamının bulunduğu durumlarda, kan hücre sayımlarında kullanılan "hemositometre"lerden de aynı amaçla yararlanılabilir.

Thoma lamının esası 0.1 mm³'lük bir hacimde (yani 0.1 ml'lik bir hacimde) sayım yapılmasıdır. Ancak bu yöntemde sonuçlar incelenen sıvı örneğin ml'sindeki toplam maya hücre sayısı (canlı ve ölü) veya spor sayısı olarak hesaplanır ve rapor edilir.

Thoma lamının üzerinde dik yönde iki çukur kanal bulunmaktadır. Bu iki kanal birbirine tam ortadan dik kesecek şekilde diğer bir kanalla bağlanmıştır (H harfi oluşturacak şekilde). Bu H şeklinin üst ve alt kısmında iki ayrı sayım sahası bulunmaktadır. Sayımlar bu iki sahada gerçekleştirilir ve ortalama alınarak sayım sonuçları verilir.

Bir sayım sahasında 16 büyük kare, her büyük kare içinde de 25 küçük kare vardır. Buna göre de bir sayım sahasında 16 x 25 = 400 küçük kare bulunmaktadır.



Şekil 2.3: Thoma lamının sayım yapılan kareleri (toplam görüş sahası)

Bu işlem için Thoma lamı üzerinde bulunan sayım bölgelerinden faydalanılır. Sayım bölgesinin toplam alanı 1 mm^2 'dir. Lamel yapıştırıldığında sayım bölgesinin yüksekliği de $0,1 \text{ mm}$ 'dir. Sayım işlemini kolaylaştırmak amacıyla her bir sayım bölgesi de kendi içerisinde karelere bölünmüştür.

MATERYAL-METOT

***Thoma Lamıyla Maya Hücrelerinin Sayımı**

Cihazlar/Malzemeler:

Thoma lamı, maya kültürü, otomatik pipet, lamel

Metot:

Maya hücre kültüründen eğer gerekli ise dilüsyon hazırlanır.

Kültürden $10 \mu\text{l}$ alınır ve thoma lamına eklenir.

İnceleme yapılır ve hücreler sayılır. Ana stoktaki hücre miktarı hesaplanır.

8.HAFTA: Mikrobiyolojide Biyokimyasal Testler/ Ökaryot Hücre Kültürü Temel Teknikleri, Pipet Kullanımı

Mikrobiyal Beslenme

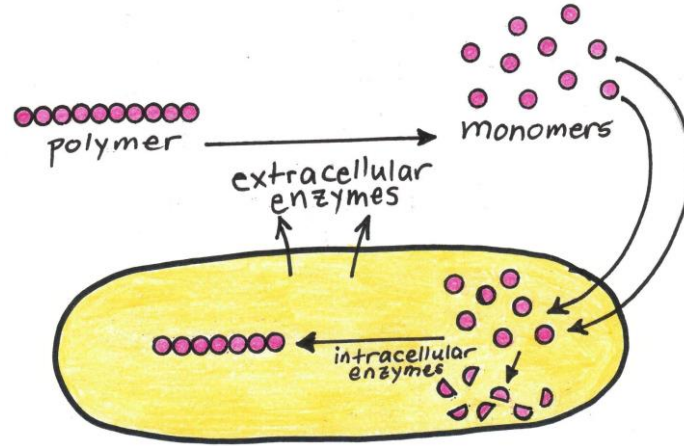
Mikroorganizmalar da (virüsler hariç) her canlı gibi beslenmek ve besinlerini metabolize etmek durumundadır. Mikroorganizmalar geliştikleri besi ortamından küçük molekül ağırlıklı besin öğelerini (glukoz, fruktoz gibi monosakkaritler, aminoasitler, yağ asitleri, alkoller vb.) hücre içerisine direkt olarak taşıyabilir. Besi ortamındaki proteinler, polisakkaritler (nişasta, selüloz, glikojen vb.), oligosakkaritler (rafinoz vb.), disakkaritler (laktoz, maltoz, sakkaroz vb.) ve yağlar gibi büyük molekül ağırlıklı besinleri ise direkt olarak hücre içerisine taşıyamaz. Bu maddelerin hücre içerisine taşınması için besiyeri ortamında kendilerini oluşturan küçük molekül ağırlıklı bileşenlerine hidroliz edilmeleri (su varlığında parçalanmaları) gerekmektedir. Bu bileşenlerin hidrolizi, mikroorganizmaların besi ortamına saldıkları spesifik «ekstraselüler enzimler» aracılığı ile olmaktadır.

Proteazlar, lipazlar, amilazlar mikroorganizmaların besiyeri ortamına saldıkları ekstraselüler enzim örnekleridir. Her mikroorganizma ancak belirli bazı ekstraselüler enzimleri üretip hidroliz amaçlı dışarı salgılayabilmektedir.

Mikrobiyal Metabolizma

Metabolizma, mikroorganizma hücresi içerisinde gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonların tümüdür. Hücre içerisinde «katabolizma (yıkım)» ve «anabolizma (biyosentez; yapım)» adı verilen iki tip metabolizma olayı gerçekleşmektedir. Katabolizma (katabolik reaksiyonlar) sonucunda «enerji» ve birtakım «katabolizma ürünü maddeler» elde edilir. Katabolizma, hücre içerisinde fonksiyon gösteren intraselüler nitelikteki «katabolik enzimler» tarafından gerçekleştirilir. Anabolizma (anabolik reaksiyonlar) sonucunda birtakım «biyosentetik anabolizma ürünü maddeler» elde edilir. Anabolizmanın gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç vardır, bu amaçla katabolizmadan sağlanan enerji kullanılır. Katabolizma, hücre içerisinde fonksiyon gösteren intraselüler nitelikteki «anabolik enzimler» tarafından gerçekleştirilir.

Her mikroorganizma ancak belli bazı anabolik ve katabolik enzimleri üretebilir. Buna bağlı olarak belirli bazı anabolizma ürünü maddeler oluşturabilmektedir.



Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal testler; mikroorganizmaların spesifik enzim (ekstraselüler enzimler, intraselüler katabolik ve anabolik enzimler) varlıklarının veya aktivitelerinin ortaya konması veya çeşitli yıkım (katabolizma) ya da yapım (anabolizma) ürünü maddelerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen testlerdir. Biyokimyasal testlerin, bakteri ve mayaların tanımlanmasında çok önemli yerleri vardır. Çünkü her

mikroorganizma kendine özgü enzimlere sahip olup, belirli maddeleri yine kendine özgü bir biçimde metabolize ederek, çeşitli yıkım ve yapım ürünleri meydana getirmektedir.

Bilinen bakterilerin tümünü, belli taksonomik gruplar içinde ele alınmış, biyokimyasal özellikleri de dahil olmak üzere pek çok özelliğini tek tek veya listeler halinde açıklanmıştır (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology). Bilinmeyen ve tanımlanmak istenilen bakteri veya mayalara belirli biyokimyasal testler uygulanır ve elde edilen sonuçlar kaynaklara aktarılır.

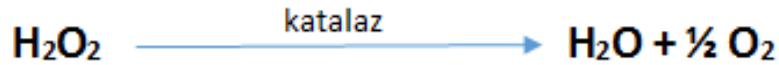
Tests	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.dysenteriae</i>	<i>S.typhimurium</i>	<i>S.aureus</i>	<i>K.pneumoniae</i>
TSI	+	-	+	+	+	+
Methyl Red	+	-	+	+	+	-
Indole	+	-	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	+	-	-	+	+
Utilisation						
Urease	+	+	-	-	+	+

Katalaz Testi

Katalaz → Enzim

Genellikle aerobik mikroorganizmalar tarafından oluşturulur. Ortamdaki hidrojen peroksiti, su ve oksijene ayırıştırır.

Aerobik mikroorganizmalar ile bazı fakültatif anaerobik ve mikroaerofilik mikroorganizmalar katalaz enzimi üretebilir. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *E. coli*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* katalaz pozitif bakterilere örnektir. Sıvı veya katı bakteri kültürlerine H₂O₂ ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenir hale gelmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla da katalaz enziminin varlığını gösterir.

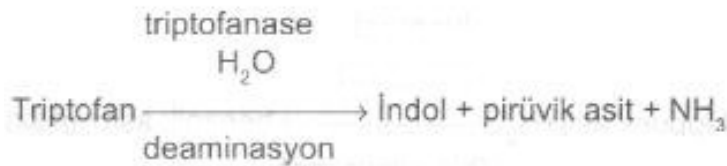


Koagülaz Testi

Koagülaz enzimi birçok bakteri tarafından oluşturulmasına karşılık, koagülaz testine daha çok «toksik S. aureus suşları» ve «toksik olmayan S. aureus suşları» birbirinden ayırmak için kullanılır. Toksik S. aureus suşları hemolitik (kanı belli bir tarzda hemoliz eder) ve koagülaz ve termotabil Dnaz enzimlerini üretme yeteneğindedir. Sitafilokoklar için toksisitenin en önemli ölçütü koagülaz enziminin varlığıdır. Diğer önemli ölçütleri ise hemoliz özelliği, termotabil Dnaz varlığı ve manitolü fermentasyonu etmesidir. Koagülaz enzimi «kan plazması»nu koagüle eder (pıhtılaştırır). Bu nedenle koagülaz testi için kan plazması kullanılır.

İndol Testi

Bakterinin triptofan bulunan besiyerinde triptofandan indol oluşturup oluşturmadığını ortaya koymak amacıyla uygulanır. Bazı bakteriler ortamdaki triptofanı enzimatik hidrolize uğratarak indol oluştururlar.



Metil Kırmızısı Testi

Bakterinin glukoz bulunan besiyeri ortamında glukozdan organik asitler oluşturup oluşturmadığını ortaya koymak amacıyla uygulanır. Bazı bakteriler ortamdaki glukozu metabolize ederek çeşitli organik

asitler oluştururlar. Organik asitler ortamın pH'sını düşürmektedir. Besiyeri ortamının pH'sındaki bu düşüşü belirlemek için, kültüre «metil kırmızısı indükatörü» eklenmektedir. Glikozun fermentatif metabolize olması sonu besi yerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır.

Voges-Proskauer Testi

Voges-Proskauer testi bakterilerin glukoz bulunan besiyerinde glukozdan nötral ürünler (asetoin: asetil metil karbinnol ve bunun redüksiyon ürünü olan 2,3-bütillen glikol gibi) oluşturup oluşturmadığını ortaya koymak amacıyla uygulanır. Bazı bakteri türlerini (*K. pneumoniae* (+), *E. coli* (-) belirlemede kullanılır. Glikoz, önce pirüvik asite metabolize olur. Pirüvik asidin ayrışması, bakterilerin türlerine göre aerobik veya anaerobik yolla olur. Glikozun fermentasyonu sonu asetoin ve bunun bir nötral redüksiyon ürünü olan 2,3 -butanediol meydana gelmektedir. Asetoin, ortama alkali bir madde eklendiğinde oksidasyona uğrayarak diasetil'e dönüşür. Diasetil peptondaki kreatin, arjinin veya kreatinin ile birleşerek pembe-kırmızı bir renk oluşumuna sebep olur.

Sitrat Testi

Bakterilerin sitrat bulunan besiyerinde sitrati tek karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmadığını belirlemek amacıyla başvurulmaktadır. Bazı bakteriler karbon ve enerji kaynağı olarak sitrati, azot kaynağı olarak da amonyum tuzlarını kullanabilirler.

İMVİC Testi

İndol Metil Kırmızısı Voges-Proskauer Sitrat

İndol, Metil Kırmızısı, Voges-Proskauer ve Sitrat testlerinden oluşan kombine bir testtir. Dört farklı test yapılır, dört farklı sonuç alınır ve bir bütün olarak değerlendirilir.

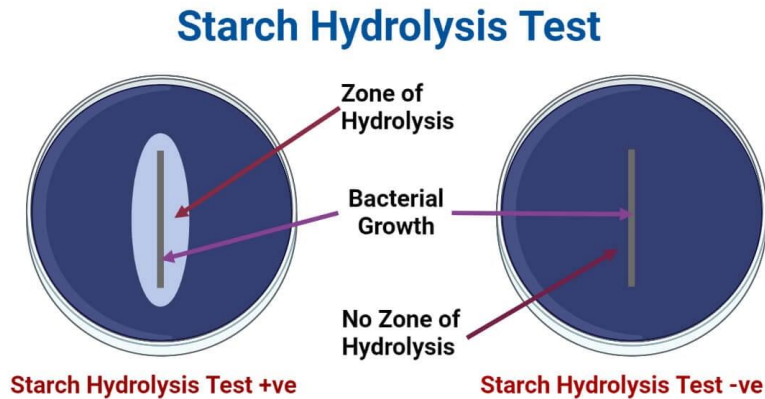
Özellikler «koliform grubu» bakterileri birbirinden ayırmakta kullanılan bir testtir.

Koliform grubu bakteriler:

İnsan vücudu sıcaklığında (35-37°C) laktozdan asit ve gaz oluşturan, çubuk şekilli, Gram negatif bakterilerdir.

Nişasta Hidrolizasyon Testi

Nişastanın, bazı mikroorganizmalarca sentezlenen ekstrasellüler amilaz enzimi tarafından hidrolizasyonunu ortaya koymak amacı ile yapılır. Pozitif reaksiyonlarda, koloni etrafında renksiz bir halka oluşur (alfa-amilase enziminin nişastayı hidrolizasyonu sonu). Nişasta + Iyot çözeltisi (lugol) Mavi- mor renk verir.



MATERYAL-METOT

*Katalaz Testi

Cihazlar/Malzemeler:

Farklı bakteri kültürleri, lam, hidrojen peroksit

Metot:

Farklı bakteri kültürlerinden lam üzerine 1 damla damlatıyoruz.

Üzerlerine 1 damla hidrojen peroksit çözeltisi damlatıp reaksiyonu inceliyoruz.

*Nişasta Hidrolizasyonu Testi:

Cihazlar/Malzemeler:

Farklı bakteri kültürleri, lam, hidrojen peroksit

Metot:

Nişastalı katı besiyerinde inkübe edilmiş bakterilerin üzerine 1/5 sulandırılmış lugol çözeltisinden petri yüzeyini kaplayacak şekilde döküyoruz. Reaksiyonu inceliyoruz.

Ökaryot Hücre Kültürü Temel Teknikleri, Pipet Kullanımı

Ökaryotik hücre kültüründe kullanılan temel teknikler, hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyütülmesi ve sürdürülebilmesi için önemli adımlardır. Hücre kültürü yapılırken kullanılacak ekipmanlar temel olarak yapılan çalışmaya göre belirlenir. Fakat bütün hücre kültürü laboratuvarlarının temel olarak patojenik mikroorganizma barındırmama ve de bir kısım ortak ekipmanları bulundurma gibi özellikleri olmalıdır.

Hücre Kültürü Ekipmanları

Temel Ekipmanlar	Yaygın Ekipmanlar	Ek Malzemeler
<ul style="list-style-type: none">• Laminar Kabin• İnkübatör• Su Banyosu• Santrifüj• Buzdolabı (+4°C) ve dondurucu (-20°C)• Hücre sayacı (otomatik veya hemositometre)• İvert Mikroskop• Sıvı azot• Otoklav	<ul style="list-style-type: none">• Aspirasyon pompası (peristaltik veya vakum)• pH metre• Konfokal Mikroskop• Flow Sitometre	<ul style="list-style-type: none">• Hücre büyüme kapları (flask, petri kabı, çok kuyulu plate)• Pipet ve pipetör• Şırınga ve şırınga ucu• Atık kapları• Medyum, serum ve ajanlar• Hücreler

Hücre kültürü besiyerleri (medyumları), hücrelerin in vitro (laboratuvar ortamında) büyüebilmesi ve çoğalabilmesi için gerekli olan tüm besin maddelerini içeren sıvı veya jel/katı yapılı çözeltilerdir. Bu besiyerleri, hücrelerin tipine ve ihtiyaçlarına göre özelleştirilmiş farklı bileşenlerden oluşabilir. Hücrelerin beslenebilmesi için gerekli glikoza, canlılıklarını sürdürebilmeleri için uygun ozmolarite ve pH'a, fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için gerekli aminoasitlere ve vitaminlere sahiptirler.

Genellikle bir hücre kültürü besiyerinin içeriği şunları kapsar:

Amino Asitler: Hücrelerin metabolik işlemleri için gerekli temel yapı taşlarıdır. L-glutamin, hücre kültürü ortamlarında önemli bir amino asittir ve hücre büyümesi için kritik öneme sahiptir.

Karbon Kaynakları (Glukoz): Hücrelerin enerji üretimi için karbon kaynağı sağlar.

Vitaminler: Hücre büyümesini desteklemek ve çeşitli biyokimyasal süreçlerde görev almak için gereklidirler.

İnorganik Tuzlar/İyonlar: Hücre içi ve hücre dışı iyon dengesi için önemlidir. Özellikle kalsiyum (Ca^{2+}), magnezyum (Mg^{2+}), sodyum (Na^+), potasyum (K^+), ve fosfat (PO_4^{3-}) hücrelerin homeostazının korunmasına katkıda bulunur.

Büyüme Faktörleri ve Hormonlar

Hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağlıklı kalmasını destekleyen proteinlerdir. Örneğin, epidermal büyüme faktörü (EGF) veya insülin gibi maddeler belirli hücre tiplerinin büyümesini teşvik eder.

Serum (Fetal Sığır Serum - FBS) !!!

Hormonlar, enzimler, hücrelerin çoğalmasını ve büyümesini sağlayan büyüme faktörleri, yüzeylere tutunabilmesini sağlayan matris proteinlerini ve diğer gerekli maddeleri içerir. Hücrelerin çoğalmaları ve tutunmaları için kullanılan zengin bir protein çözeltilisidir. FBS (Fetal Bovine Serum), hücre kültürlerinde en yaygın kullanılan serumdur ve hücre büyümesini teşvik eder. Hücre çeşidine ve uygulamalarına göre hücre kültüründeki serum oranı değişebilir. $-20^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

Genelde Tercih Edilen Hücre Kültürü Besiyerleri Türleri:

- **MEM (Minimum Essential Medium)**

Hücrelerin minimum ihtiyaçlarını karşılayan bir medyumdur ve genellikle non-kanser hücrelerinin büyümesinde kullanılır. Modifiye edilmiş versiyonları farklı hücre tipleri için özelleştirilebilir.

$+4^{\circ}C$ 'de muhafaza edilir.

- **DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)**

Yüksek glukoz içeriği ve zengin amino asit yapısı sayesinde memeli hücreleri için yaygın olarak kullanılır. İhtiyaca göre yüksek veya düşük glukoz konsantrasyonlarına sahip varyasyonları vardır.

- **RPMI 1640**

Lenfositler, tümör hücreleri ve birçok primer hücre kültürü için kullanılan bir besiyeridir. Genellikle kan hücresi kültürlerinde tercih edilir.

- **Opti-MEM**

Az miktarda serum içeren düşük serumlu bir medyumdur. Genellikle transfeksiyon ve protein üretimi çalışmaları için kullanılır.

Serumsuz Besiyerleri (Serum-Free Media)

Büyüme faktörleri ve hormonların yapay olarak eklendiği, hayvan serumları içermeyen medyum türleridir. Genellikle spesifik hücre tipleri için geliştirilmişlerdir ve hücrelerin belirli koşullar altında büyümesini sağlar.

***PBS (Phosphate-Buffered Saline):**

PBS, hücrelerin fizyolojik pH ve iyonik dengesini korumak için kullanılır. Temel bileşenleri: sodyum klorür ($NaCl$), potasyum klorür (KCl), sodyum fosfat ve potasyum fosfattır. Hücrelerin yıkanmasında, tripsinden önce serumun uzaklaştırılmasında kullanılabilir. PBS'in temel işlevi, hücreleri yıkamak, pH'ı dengelemek ve kısa süreli tamponlama sağlamaktır.

***Fenol Kırmızısı:**

Hücre kültüründe iyon bileşimi bakımından ekstraselüler ortama yakın olan, bunun yanı sıra hücre çoğalması için serum içeren çözeltiler kullanılır. pH 7.4 civarında olmalıdır, çoğunda pH indikatörü olarak fenol red kullanılır.

Sterilizasyon: Hücre kültürü sırasında en önemli faktörlerden biri steril bir ortamın sağlanmasıdır. Laminar akış kabinlerinde çalışılarak ortamın steril tutulması ve kontaminasyonun engellenmesi sağlanır. Malzemeler, genellikle otoklav gibi yöntemlerle sterilize edilir.

Dezenfeksiyon: Kültür kapları, pipetler ve diğer kullanılan malzemeler, işlem öncesinde dezenfekte edilir.

İnkübasyon

Hücreler, genellikle 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ oranında tutulur. İnkübatör, hücrelerin büyümesi için gerekli olan sıcaklık, nem ve gaz konsantrasyonlarını sağlar. Farklı hücre türleri farklı koşullar gerektirebilir.

Hücre Sayımı ve Canlılık Testleri

Hücrelerin büyümesini izlemek ve uygun yoğunlukta olduklarını kontrol etmek için hücre sayımı yapılır. Hemocytometer veya otomatik hücre sayma cihazları kullanılarak hücre yoğunluğu belirlenir. Hücrelerin canlılık durumu, trypan blue gibi boyalar kullanılarak değerlendirilir.

Laminar Kabin

En büyük avantajı, çalışma alanını aseptik/steril bir ortamda tutarak hücreleri, çalışılan materyali ve personeli kontaminasyon riskinden korumaktır. Çalışma sırasında hem ortamın, hem de kullanılan hücre kültürlerinin bakteriler, virüsler veya mantarlarla kontamine olmasını engeller. Böylece deneylerin güvenliği ve doğruluğu artırılır. Biyogüvenlik kabinlerinde de ön açıklıktan hava girişi olmasına rağmen, sistem bu havanın çalışma alanında dolaşıma girmeden önce HEPA filtreden geçmesini sağlayacak şekilde dizayn edilmiştir.

CO₂ İnkübatör

CO₂ inkübatörleri, hücre kültürü çalışmaları için temel cihazlardan biridir. Hücrelerin laboratuvar ortamında sağlıklı bir şekilde büyümesi, çoğalması ve metabolik faaliyetlerini sürdürebilmesi için ihtiyaç duyduğu doğru sıcaklık, nem ve gaz ortamını sağlarlar.

Invert Mikroskop

Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin morfolojik özelliklerini, büyümesini ve sağlığını gözlemlemek için kullanılan bir mikroskop türüdür. Hücre kültüründe kullanılan invert mikroskopların klasik ışık mikroskoplardan farkı, lenslerinin ve ışık kaynağının yerleşiminin tam tersi dizaynda olmasıdır. Objektifler alt kısımda, ışık kaynağı ise üst kısımda bulunur.

Santrifüj, +4°C, -20°C, -80°C, sıvı azot tankları, petri, flask, serolojik pipet, pipetör veya puar....



Flask

9.HAFTA: Hücre Kültüründe Kontaminasyon ve Kontrol Yöntemleri / Hücre Açma ve Mikroskopik Gözlem

Hücre kültüründe kontaminasyon, hücrelerin büyüme ortamına istenmeyen mikroorganizmaların veya maddelerin girmesiyle meydana gelir ve hücre kültürlerinin bozulmasına veya yanlış sonuçlara yol açabilir. Kontaminasyon, hücre kültürü çalışmalarındaki en büyük sorunlardan biridir ve deneylerin tekrarlanabilirliğini, doğruluğunu ve sonuçların güvenilirliğini ciddi şekilde etkileyebilir.

Mikrobiyal Kontaminasyon:

Bakteriler: Bakteriler hızlı çoğalma yetenekleri sayesinde kültürde büyük bir tehdit oluşturur. Kültür ortamında bulanıklık, renk değişikliği ve hücrelerin anormal morfolojisi bakteriyel kontaminasyonu gösterebilir.

Mantarlar ve Mayalar: Mantar ve mayalar sporlar aracılığıyla yayılabilir ve kültür ortamında beyazımsı veya sarımsı koloniler oluşturabilir.

Mikoplazma: Hücre kültürlerinde yaygın ve tehlikeli bir kontaminasyon türüdür. Mikoplazma, hücre dışına bakıldığında mikroskopla gözle görülemez ve hücre metabolizmasını etkileyebilir. Bu organizmalar, nispeten küçük (0.2 – 0.3 µm), hücre duvarı bulunmayan ve dolayısıyla penisilin ve bu yapıya benzer antibiyotiklere karşı direnç gösteren organizmalardır. Mikoplazmalar, küçük ve hücre duvarı olmayan bakterilerdir, bu nedenle geleneksel mikrobiyal kontaminasyon yöntemleriyle tespit edilmesi zordur. Hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonunun tespiti, hücrelerin sağlığını ve deney sonuçlarını ciddi şekilde etkileyebilir.

Belirtileri: Hücre büyüme ve morfolojisinde değişiklikler (yavaş büyüme, anormal morfolojiler), pH değişiklikleri, besin eksikliği belirtileri, antibiyotiklere dayanıklılık.

Doğrudan mikroskop altında tespit edilemiyor. Mikoplazmalar, tipik mikroskoplarla görülemezler çünkü çok küçüktürler (0.1-0.3 mikrometre) ve hücre duvarları yoktur. Hücreler sağlıklı görünüyebilir, ancak mikoplazma yine de mevcut olabilir. PCR, floresan boyama yöntemleri, ELISA, çeşitli ticari kitler ile tespit edilebilir.

Virüsler: Virüs kontaminasyonu, hücrelerin sağlığını ve büyüme hızını olumsuz etkileyebilir ve biyolojik güvenlik riski oluşturabilir.

Hücre kültüründe kontaminasyon, deneylerin güvenilirliği ve hücrelerin sağlığı açısından büyük bir sorundur. Kontaminasyonu engellemek, dikkatli ve sistematik bir şekilde aseptik teknikler uygulamayı gerektirir. Hücre kültürü ortamında yaygın olarak karşılaşılan kontaminasyon kaynakları arasında bakteriler, mantarlar, mayalar, virüsler ve mikoplazmalar yer alır. İşte kontaminasyonu önlemek için alınması gereken temel önlemler ve yöntemler:

- **Laminar Flow Kabininde Çalışma:** Hücre kültüründe her türlü işlem laminar akış kabininde yapılmalıdır. Laminar akış kabinleri, hava akışını düzenleyerek steril bir çalışma ortamı sağlar.
- **Steril Ekipman Kullanımı:** Tüm pipetler, pipet uçları, şişeler, kaplar ve diğer malzemeler otoklavlanmış veya steril olarak paketlenmiş olmalıdır.
- **Ellerin ve Malzemelerin Dezenfeksiyonu:** Hücre kültürü yapmadan önce ellerin uygun şekilde steril eldiven giyerek temizlenmesi ve kullanılan tüm yüzeylerin %70 etanol veya uygun bir çözelti ile dezenfekte edilmesi gerekir.
- **Kapakları Mümkün Olduğunca Kısa Süre Açık Bırakma:** Hücre kültür kaplarının kapakları sadece kısa süreler için açılmalı ve gereksiz yere açık tutulmamalıdır.

- **Steril Medyum ve Reaktifler:** Besiyerleri, serumlar ve diğer sıvı reaktifler kullanılmadan önce filtrelenerek sterilize edilmelidir. Besiyerleri genellikle 0.22 mikron filtreler ile filtre edilerek steril hale getirilir.
- **Serumların Test Edilmesi:** Fetal bovine serum (FBS) gibi eklenmiş serumlar, kontaminasyon riskini artırabileceğinden, mikoplazma ve diğer kontaminasyonlar açısından test edilmelidir.
- **Antibiyotiklerin Kullanımı:** Antibiyotikler (örneğin, Penicillin-Streptomycin) bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmek için kullanılabilir.
- **İnkübatörlerin Düzenli Temizliği:** Hücre kültüründe kullanılan CO₂ inkübatörler düzenli olarak temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir. Su tepsilerinde oluşan mikrobiyal gelişimi engellemek için su düzenli olarak değiştirilmelidir ve steril su kullanılmalıdır.
- **Laminar Kabin Temizliği:** Laminar akış kabinleri kullanımdan önce ve sonra %70 etanol ile temizlenmeli, kabin içindeki UV lambası düzenli olarak çalıştırılmalıdır.
- **Laboratuvar Düzeni:** Çalışma alanı her zaman düzenli ve temiz olmalıdır. Gereksiz malzemeler kabinde bulundurulmamalıdır.
- **Yeni Hücre Hatlarının Test Edilmesi:** Yeni elde edilen hücre hatları, kültüre başlamadan önce mutlaka mikoplazma, bakteri ve mantar kontaminasyonu açısından test edilmelidir.
- **PCR (Mikoplazma İçin):** Hücre kültürlerinde en yaygın kontaminasyon kaynaklarından biri mikoplazmadır. Mikoplazmanın varlığı PCR testi ile düzenli olarak kontrol edilmelidir.
- **Gram Boyama:** Bakteriyel kontaminasyonu tespit etmek için hücre kültüründen alınan numunelerde Gram boyama yapılabilir.
- **Floresan Boyama:** DNA'ya bağlanan floresan boyalar (Hoechst veya DAPI) kullanılarak hücre dışındaki mikroorganizmalar tespit edilebilir.
- **Laboratuvar Personel Eğitimi:** Tüm laboratuvar personeli, aseptik teknikler ve kontaminasyon kontrolü konusunda eğitilmelidir. Uygun sterilizasyon yöntemlerini ve kontaminasyonu önlemek için gerekli prosedürleri bilmelidirler.

MATERYAL-METOT

*Ökaryotik Hücre Kültürü Açma/Hazırlama

Cihazlar/Malzemeler:

DMEM, FBS, L-Glutamin, Antibiyotik, Hücre flaskı, falkon tüp, santrifüj, ökaryotik hücre hattı, serolojik pipet, pipetör, trypan blue

Metot:

% 10 FBS, % 1 antibiyotik, % 1 L-Glutamin içeren DMEM besiyeri uygun hacimlerde hazırlanır.

Sıvı azot tankından alınan hücre kültürü 37°C'de eritilir.

Haazırlanan DMEM'den 1 mL alınır ve 15 mL falkona konulur.

İçerisine kriyotüpteki hücre kültürü eklenir ve hafif pipetaj yapılır.

15 uL kültürden alınır + 15 uL tripan mavisi boyası eklenir.

Thoma lamı ile hücre sayımı yapılır. Ölü ve canlı hücreler tespit edilir.

25 mL flask içerisine 3 mL hazırlanan DMEM'den konulur.

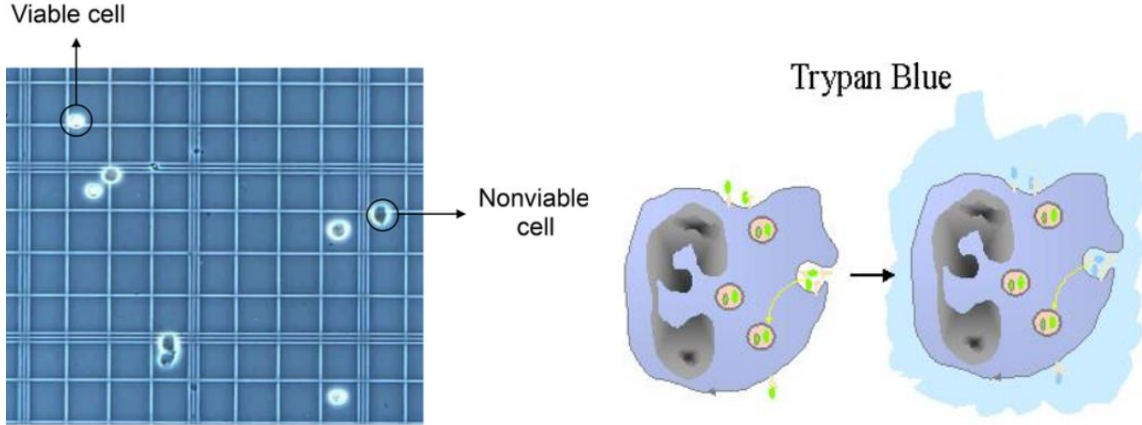
Üzerine uygun miktarsa hücre kültüründen eklenir.

37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilir.

10.HAFTA: Hücre Sayımı, Pasajlama ve Dondurma Yöntemleri

HÜCRE SAYIMI

Sitotoksiste testleri, transfeksiyonlar, hücre füzyon teknikleri, kriyoprezervasyon ve alt kültür rutinleri gibi işlemlerden önce hücre sayısını ölçmek gerekir. Tripan mavisi, hücre sayımı ve hücrelerin yaşayabilirliğini ölçmek için mikroskopta en sık kullanılan boyadır. Tripan mavisi prensibi, kromoforun negatif yüklü olduğu ve zar zarar görmedikçe hücre ile etkileşmediği gerçeğine dayanır. Hücre zarı zarar görmeyen hücreler boyayı içlerine almazlar ve canlı hücrelerdir ve parlak görünürler. Ancak hücre zarı zarar gören yani ölü hücreler boyayı içlerine alır ve mavi renk görünür.



Otomatik Hücre Sayıcılar

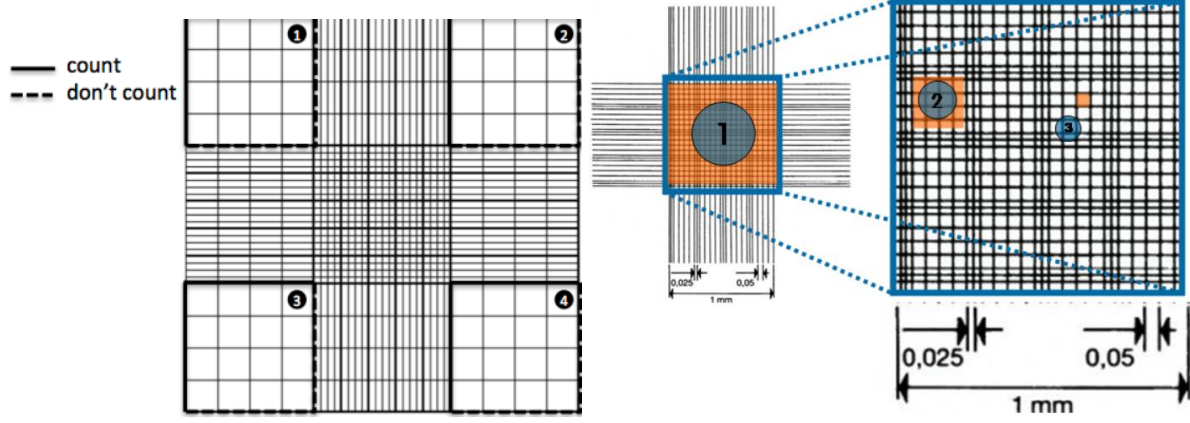


Hücre canlılığı testi için standart tripan blue tekniğini kullanan, dijital görüntü yakalayan, hücre sayımı, hücre boyutu ve hücre popülasyonundaki yüzde canlılık oranını veren sofistike görüntü analiz programıdır. Cihaz, taze ve homojen hücre örneği ile en iyi sonucu vermektedir. Hücreler yaklaşık 1×10^6 hücre/mL konsantrasyon ile toplanır ve süspanse edilir. Hücreler eşit hacimdeki 0.4% tripan 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

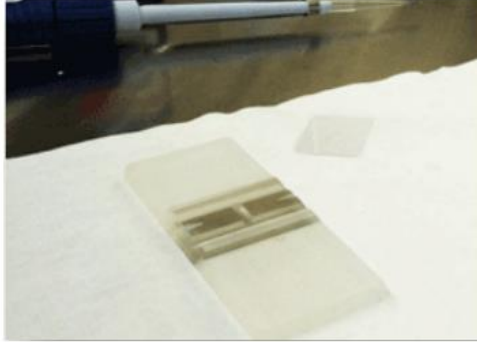
Hemasitometre her biri 1 x 1 mm olan 9 kareye bölünmüş iki bölmesi olan, örgülü-cam lamaların kullanıldığı bir metottur. Hücre süspanسیونu kapiler hareketlerle bölmeye doğru ilerler. Hücreler her 1 x 1 mm kare için 0.1 μ L olacak şekilde uzanır ve manuel olarak sayılır. Her kare için hesaplanan hücre sayısı ve seyreltme faktörü mililitredeki orijinal hücre konsantrasyonunu (hücre sayısı/ml) hesaplamak için kullanılır. Mikroskopla chambera bakıldığında, chamberdaki 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 dür. 1 cm^3 1 ml 'ye eşdeğerdır, ml ' deki hücre konsantrasyonu ise ortalama her bir kare $\times 10^4$ 'tür. Eğer herhangi bir seyreltme varsa hücre konsantrasyonu hesaplanırken formüle ilave edilmelidir.

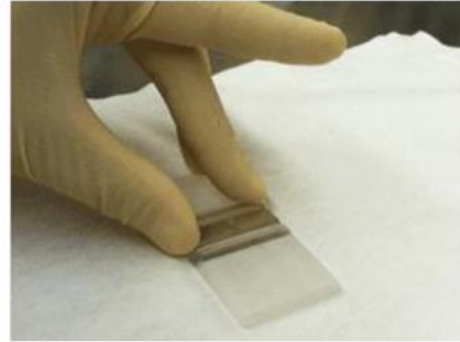


Köşelerde bulunan dört büyük karedeki toplam hücre sayısı hesaplanır. Eğer hücreler köşe karelerdeki 4 çeper tarafına da dokunuyorsa, yalnızca 2 dış yan ya da iki iç yan olarak iki taraftaki hücreler sayılır.

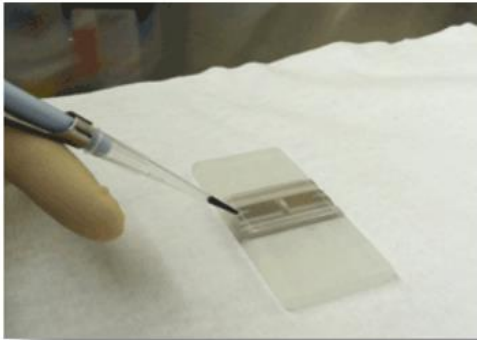
$$\text{Canlı hücre konsantrasyonu (Hücre/mL)} = (\text{Canlı hücre sayısı}/4) \times 10^4 \times \text{Seyreltme Faktörü}$$



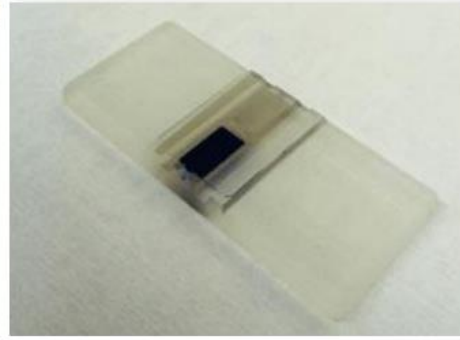
Adım 1: Thoma lamı %70 etanol ile temizlenir.



Adım 2: Lamel thoma lamı üzerine yerleştirilir.



Adım 3: 10 µl örnek lamel ve thoma lamı arasına dikkatlice yerleştirilir.



Adım 4: Thoma lamı dikkatlice mikroskop altına yerleştirilir ve hücre sayımı yapılır.

HÜCRE PASAJLAMA

Pasaj olarak da adlandırılan alt kültürleme, besi ortamın uzaklaştırılması ve hücrelerin önceki kültürden taze büyüme ortamına aktarılmasıdır. Hücre hattının veya hücre suşunun daha da çoğaltılmasını sağlayan bir prosedürdür. Bir deneye başlamadan önce kullanılan hücre hattının büyüme özelliklerini bilmek ve kaydetmek önemlidir. Hücresel büyümedeki bir değişiklik, hücre hattı için önemli bir problemi gösterebilir ve tespit edilmezse deneysel sonuçlar üzerinde zararlı etkileri olabilir. Hücrelerin pasajlanabilmesi için hücre kültür flakslarının yüzeyini kaplamış olmalıdır. Böyle flakslara konfülent flakslar denir. Pasajlama işlemi hücreler sıkışık konumda olduğu için yapılır. Ve daha geniş alana yayılır. Pasajlama işlemi besi ortamı içerisindeki hücrelerin nutrientleri tüketmesinden dolayı üreme hızlarının düşmesini ölümlerini önlemek amacı ile yapılır.

Hücre Büyümesi Aşamaları:

1) Lag Fazı:

Bu aşamada hücreler bölünmez. Bu süre zarfında hücreler kültür koşullarına uyum sağlar. Bu fazın uzunluğu, alt kültür sırasında hücre hattının büyüme fazına ve ayrıca ekilen hücre sayısına bağlı değişebilir.

2) Log (Logaritmik artış) Fazı:

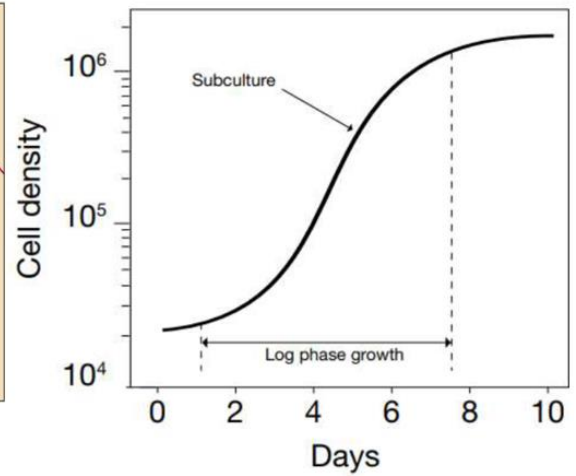
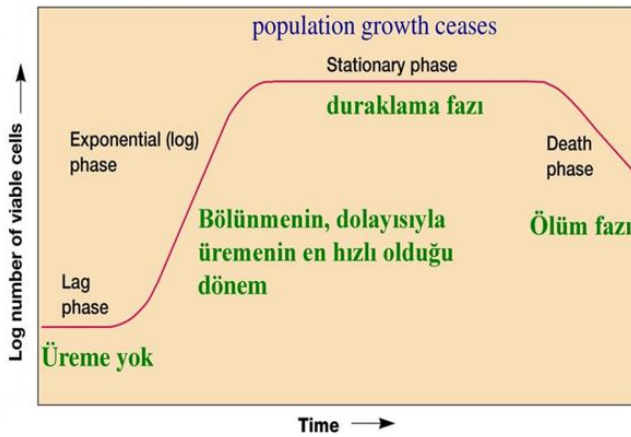
Hücreler aktif olarak çoğalır ve hücre yoğunluğunda üstel bir artış meydana gelir. Hücre popülasyonunun bu aşamada en yüksek canlılık oranına ulaşır. Bu nedenle bu aşamada hücre fonksiyonunun değerlendirilmesi önerilir. Her hücre hattı log fazı boyunca farklı hücre proliferasyon kinetiği gösterecektir. Dolayısıyla bu aşama popülasyonun ikiye katlanma süresini belirlemek için en uygun aşamadır. Hücreler de genellikle geç log fazında pasajlanır. Hücrelerin çok geç pasajlanması, aşırı hücre yoğunluğuna, apoptoza ve yaşlanmaya neden olabilir.

3) Durağan Faz:

Hücre çoğalması, hücrelerin birbirine temas etmesi nedeniyle yavaşlar. Bu aşamada aktif hücre döngüsündeki hücre sayısı % 0-10'a düşer ve hücreler zarar görmeye en duyarlı oldukları durumdadır.

4) Ölüm (Düşüş) Fazı:

Hücre ölümü bu aşamada baskındır ve canlı hücre sayısında ciddi bir azalma vardır. Hücre ölümü sadece besin miktarındaki azalmadan değil, aynı zamanda hücresel döngünün doğal yolundan da kaynaklanmaktadır.



Kültür Ortamını Etkileyen Faktörler

-Serum:

Büyüme faktörleri, yapışma faktörleri, hormonlar, lipidler ve mineralleri içeren serum hücre kültürü için hayati öneme sahiptir. Hücre zarı geçirgenliğini düzenler. Hücreler alınacak lipitler, enzimler, mikro besinler ve eser elementler için bir taşıyıcı görevi görür. Hücre hatlarının büyük bir kısmı aminoasitleri, vitaminleri, inorganik tuzları ve glukoz gibi karbon kaynaklarını içeren bazal besiyerinde iyi bir büyüme gösterirler. Ancak bu besiyerleri serum ile desteklenmelidir. Serum, bazal besiyerinde hücre kültürü için gerekli olan büyüme ve adhezyon faktörlerinin, hormonların, yağların ve minerallerin kaynağı olarak önemlidir. Ayrıca, serum hücre membran geçirgenliğini düzenler ve lipitlerin, enzimlerin ve mikro besinlerin taşıyıcısı olarak görev alır. Buna rağmen, serum kullanımının yüksek maliyet, standardizasyon problemleri, özgüllük ve stimülasyon ya da hücre kültüründeki hücresel fonksiyonların inhibisyonu gibi dezavantajları bulunmaktadır.

-pH seviyesi:

Çoğu memeli hücre hattı pH 7.4'te daha iyi büyüme göstermektedir ve farklı hücre gerilmeleri için çok küçük farklılıklar bulunmaktadır. Buna rağmen, bazı hücre hatları ise daha asidik ortamlarda daha iyi büyüme gösterirler (pH 7.0–7.4) ve bazı fibroblast hücre hatları daha temel ortamları tercih ederler (pH 7.4–7.7). Sf9 ve Sf21 gibi böcek hücre hatları ise pH 6.2'de optimal büyüme gösterirler. Çoğu ticari kültür ortamı, **pH indikatörü** olarak fenol kırmızısını içerir, böylece ortamın pH durumu sürekli olarak takip edilebilir **Renk sarı (veya mor) olduğunda genellikle kültür ortamı değiştirilmeli / yenilenmelidir.**

Cell line	Optimal pH
Mammalian cell lines	7.4
Transformed cell lines	7.0 – 7.4
Normal fibroblast cell lines	7.4 – 7.7
Insect cell lines	6.2

-CO₂ Seviyesi:

Kültürün pH 'sini kontrol eder ve kültürdeki hücreleri pH değişimlerine karşı tamponlar. Tamponlama, organik (ör., HEPES) veya CO₂ -bikarbonat bazlı bir tampon ile gerçekleştirilir. Çoğu hücre kültürü deneyi için %4-10 CO₂ oranı yaygın olarak kullanılır. PH'ın düzenlenmesi, hücre ekiminden hemen sonra özellikle önemlidir. Genellikle iki tamponlama sisteminden biri ile elde edilir;

i) Gaz halindeki CO₂'nin kültür ortamında CO₃/HCO₃ içeriği üzerinden gerçekleştirdiği bir tamponlama sistemi;

Doğal bikarbonat/CO₂ tamponlama sistemleri kullanan kültürlerin, genellikle bir CO₂ inkübatöründe % 5-10 CO₂ içeren bir atmosferde muhafaza edilmesi gerekir. Bikarbonat/CO₂ düşük maliyetlidir, toksik değildir ve ayrıca hücrelere başka kimyasal faydalar sağlar.

ii) HEPES adı verilen bir zwitterion kullanılarak kimyasal tamponlama;

HEPES, pH 7.2-7.4 aralığında üstün tamponlama kapasitesine sahiptir, ancak nispeten pahalıdır ve daha yüksek konsantrasyonlarda bazı hücre tipleri için toksik olabilir. HEPES tamponlu kültürler kontrollü gaz atmosferi gerektirmez.

-Sıcaklık:

Hücre kültürü için optimum sıcaklık büyük ölçüde hücrenin izole edildiği konağın vücut sıcaklığına bağlıdır. Çoğu insan ve memeli hücre hattı optimal büyüme için 36°C ve 37°C'de sürdürülür.

Cell line	Optimal Temperature
Human and mammals	36°C - 37°
Insect cells	27°C
Avian cell lines	38.5°C
Cold-blooded animals (e.g., amphibians, cold-water fish)	15°C - 26°C

-Besiyeri:

Besiyeri, kültür ortamının en önemli bileşenidir çünkü hücre büyümesi için gerekli besinleri, büyüme faktörlerini ve hormonları sağlar, ayrıca kültürün pH'sını ve ozmotik basıncını düzenler. Besiyerinin temel bileşenleri;

- **İnorganik tuzlar:** İnorganik tuzların ortama dahil edilmesi hücrelerin bazı önemli işlevleri yerine getirmesine yardımcı olur. Öncelikle hücrelerin ozmotik dengesini korumaya ve sodyum, potasyum ve kalsiyum iyonları sağlayarak membran potansiyelini düzenlemeye yardımcı olurlar. Bunların hepsi, hücre bağlanması için hücre matriksi olarak görev alır ve enzim kofaktörleri olarak gereklidir.
- **Karbonhidratlar:** Hücrenin ihtiyaç duyduğu enerji genellikle şeker şeklinde karbonhidratlardan türetilir. Kullanılan başlıca şekerler glikoz ve galaktozdur, ancak bazı ortamlar maltoz veya fruktoz içerir. Şeker konsantrasyonu, bazı daha karmaşık ortamlarda 1 g / L ila 4.5 g / L içeren bazal ortamdan değişir.
- **Amino asitler:** Amino asitler proteinlerin yapı taşlarıdır. Hücreler bazı esansiyel aminoasitleri kendileri sentezleyemediğinden, bunların kültür ortamına eklenmesi gerekir. Kültür ortamındaki amino asitlerin konsantrasyonu, elde edilebilecek maksimum hücre yoğunluğunu belirleyecektir. Aminoasitler tükendikten sonra hücreler artık çoğalamayacaklardır.
- **L-Glutamin:** Esansiyel bir amino asit olarak özellikle önemlidir. Sıvı ortamlarda veya stok çözeltilerde glutamin nispeten hızlı bir şekilde bozulur. Optimal hücre performansı genellikle kullanımdan önce medyanın glutamin ile takviye edilmesini gerektirir. Bazı besiyerleri, daha kararlı bir glutamin formu olan ve takviye gerektirmeyen L-alanil glutamin içerir. Ortama esansiyel amino asit takviyeleri eklemek hem büyümeyi uyarır hem de hücrelerin kültürdeki canlılığını uzatır.
- **Vitaminler:** Serum hücre kültürü için önemli bir vitamin kaynağıdır. Bununla birlikte, birçok besiyeri vitaminlerle zenginleştirilmiştir ve bu da onları daha geniş bir hücre dizisi için sürekli olarak daha uygun hale getirir. Vitaminler çok sayıda kofaktör için öncüdür. Birçok vitamin, özellikle de B grubu vitaminleri, **hücre büyümesi ve proliferasyonu** için gereklidir ve bazı hücre hatları için B12 varlığı önemlidir. Bazı ortamlarda ayrıca A ve E vitaminleri bulunur. Besiyerinde yaygın olarak kullanılan vitaminler arasında **riboflavin, tiamin ve biyotin** bulunur.

- **Yağ asitleri ve lipitler:** Hücrenin temel düzeyde ihtiyacı olan ekstra selüler matriksteki akışkan yapıyı korumada yararlılardır.
- **Proteinler ve peptitler:** Albüminler, büyüme faktörleri ve büyüme inhibitörleri, aminoasitler, enzimler vb.
- **Serum:** Serum kalitesi, tipi ve konsantrasyonu hücrelerin büyümesini etkileyebilir ve bu nedenle hücre büyümesini destekleyebilmeleri açısından serumun kalitesini taramak önemlidir. Serum ayrıca yavaş büyüyen hücrelerin veya hücre yoğunluğunun düşük olduğu kültürlerin büyüme kapasitesini artırabilir (örn. Hücre klonlama deneyleri). Ayrıca mekanik hasara karşı korumaya yardımcı olur. Ek olarak serum toksinleri bağlayabilir ve nötralize edebilir. En sık kullanılan serum, **fetal sıgır serumu (FBS)**'dur.
- **Eser elementler:** Bunlar çinko, bakır, selenyum ve trikarboksilik asit ara maddeleri gibi eser elementleri içerir. Selenyum bir detoksifikatördür ve oksijen radikallerin uzaklaştırılmasına yardımcı olur.

Hücre Kültür Ortamı

3 temel ortam sınıfı vardır;

-Bazal Ortam: Amino asit, vitamin, inorganik tuzlar ve karbon kaynağı olarak glikoz içerir.

-İndirgenmiş Serum Ortamı: Serum miktarının azalması ile besin maddeleri ve hayvan kaynaklı faktörlerle zenginleştirilmiş bazal ortam formülasyonlarıdır.

-Serumsuz Ortam: Uygun beslenme ve hormonal formülasyonlar serumun tamamen yerini alır. Büyüme faktörleri ile birlikte serumsuz ortam, birincil hücre kültürü için seçici ortam yapma yeteneğine sahiptir.

Sık kullanılan ortamlar;

GMEM, EMEM, DMEM, RPMI vb. Bu medyumlar genellikle aşağıdakilerle desteklenir;

-Antibiyotik

-BSA

-Na- bikarbonat

-L-glumat

-Na- piruvat

-HEPES

-Büyüme faktörleri vb.

- Minimum Essential Medium (MEM)
- GMEMm (Glasgow Minimum Essential Medium)
- EMEM (Eagle's MEM)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Medium 199
- BME (Basal Medium Eagle)
- Ham's F-10 Medium
- Ham's F-12 Medium
- RPMI 1640 medium
- Leibovitz L-15 medium
- CMRL 1066
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-001)
- MCDB 131
- McCoy's 5A

HÜCRE DONDURMA (Kriyoprezervasyon)

Kriyoprezervasyon, hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısıya kadar soğutularak bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması adına saklanması ifade eder. Kriyoprezervasyonun en önemli amacı; istenen zamanda kullanılacak şekilde hücrelerin canlılığının korunmasıdır. Kriyoprezervasyon özellikle sınırlı bölünme özelliğine sahip hücrelerle yapılan çalışmalar için hayati önem taşımaktadır. Bu uygulama biyomedikal araştırmalar, klinik tıp, zooloji, botanik ve biyoteknoloji için çok önemlidir. Dondurulduğunda ve uygun şekilde saklandığında hücrelerin metabolizması uzun bir süre durdurulabilir ve gerektiğinde hücreler çözdürülebilir. Sıfır derecenin üstünde hücrelerin saklanması mümkün değildir. Çünkü -79 derecenin altına inilmedikçe metabolik saatin durdurulması imkansızdır.

Kriyoprezervasyonun Temel Prensipleri;

- Hücreler %90'ın üzerinde canlılık oranına sahip olacak şekilde sağlıklı olmalı ve kontamine olmamalı
- Hücreler büyümenin log fazında olmalı (bu dondurmadan 24 saat önce kültürün besiyerinin değiştirilmesiyle sağlanabilir).
- Yüksek konsantrasyonda serum/protein (>20%) kullanılmalıdır. Birçok durumda 90% oranında serum kullanılabilir
- Dimetil sülfoksit (DMSO) veya gliserol gibi kriyoprotektanlar buz kristali oluşumuna bağlı olarak gelişecek zarardan hücreleri korurlar.
- En sık kullanılan kriyoprotektan DMSO'dur. Genellikle son konsantrasyonu 10% olarak kullanılır.
- DMSO'nun farklılaşmaya yol açtığı hücre hatlarında alternatif olarak gliserol kullanılabilir.

Kriyoprezervasyon Türleri

1) -196 °C'de kriyoprezervasyon;

- Biyolojik malzemeler -196 C'de sıvı nitrojen içerisinde korunurlar
- Hücrelerin canlılığı saklanma süresinden bağımsızdır (Uzun süre canlı kalabilirler)
- Kriyoprezervasyona bağlı gelişebilecek hücresel stresler mutajenik değildir.

2) -196 °C'den daha yüksek sıcaklıklarda kriyoprezervasyon;

- Hücreler -130 ya da -135 C'de saklanırlar.

- Uzun süreli kriyoprezervasyon işlemlerinde hücrelerin canlılığı azalabilir.
- Daha çok mikrobiyal kültürler ve çok fazla hücrenin dondurulduğu/hücre canlılığındaki azalmanın pratik bir soruna neden olmayacağı kültürlerde kullanılabilir.
- Embriyo ve oositlerin bu sıcaklıklarda dondurulması uygun değildir.



3) Dondurup kurutma (Liyofilizasyon);

Liyofilizasyon veya dondurarak kurutma, ürünün dondurulmasını, basıncın düşürülmesini ve daha sonra süblimasyonla ürün içindeki donmuş suyun çıkarılmasını içeren ve düşük sıcaklıkta gerçekleştirilen dehidrasyon işlemidir. Dondurarak kurutma, üründen suyu ısı kullanarak uzaklaştıran çoğu geleneksel kurutma yöntemine zıttır. Dondurarak kurutma esnasında kullanılan düşük sıcaklık nedeniyle işlem yüksek kaliteli bir ürünle sonuçlanır ve ürünün orijinal şekli korunur

4) Vitrifikasyon;

Herhangi bir sıvının yoğunluğunun artırılarak buz kristali oluşmaksızın camsı hale getirilmesi işlemidir. Genellikle IVF uygulamalarında embriyo dondurmada kullanılır.

MATERYAL-METOT:

Cihazlar ve Malzemeler:

Eppendorf tüp, ökaryotik hücre hattı, mikropipet, 1-10 µL ve 100 µL pipet ucu, trypan blue, invert mikroskop, serolojik pipet, pipetör, T25 flask, besiyeri, tripsin, DMSO, PBS, FBS, L-glutamin, antibiyotik, thoma lamı, santrifüj, biyogüvenlik kabini, falkon tüp, etanol.

Metot:

Pasajlamanın gerekip gerekmediğini anlayabilmek için öncelikle hücre sayımı yapılır. Flaskta yeterli hücre sayısına gelindiye pasajlama yapılır.

-İşleme başlamadan önce kabin %70 etanolle silinir. Gerekli materyaller kabin içine veya kabin yanına yerleştirilir.

-İnkübatörden flask alınır, kabine geçilir. Flaskın içerisindeki besiyeri atılır ve iki kez 3 ml PBS ile yıkama yapılır.

-Flaska 1-2 ml tripsin eklenir ve 2-3 dk inkübatöre kaldırılır. Süre sonunda hücrelerin kalktığı gözle görülebilir. Ancak kesin sonuç için mikroskopta görüntüleme yapılır. Hala yapışık hücreler varsa hafif bir şekilde flaska vurulur.

-Flaska, tripsini inhibe etmek için 3-4 ml besiyeri eklenir ve flask iyice yıkanır. Sonrasında tüm sıvı çekilerek falkona aktarılır.

-5 dk 1000 rpm'de santrifüj yapılır. Çeperde pellet görüntülenir. Süpernatant atılır ve tüpe 1 ml yeni besiyeri eklenir.

-Hücre sayımı yapabilmek için ependorfun içine 50 µL tripan blue boya koyulur. Sonra hücremizi içeren tüpten 50 µL alınıp boyaya eklenir.

-Oluşturduğumuz yeni solüsyondan 10 µL alınarak thoma lamına koyulur ve mikroskopta sayım yapılır.

-Hücre konsantrasyonu belirlendikten sonra duruma göre pasajlama kriterleri belirlenir.

-Pasajlama oranı belirlendikten sonra hücre içeren falkona tam besiyeri eklenerek dilüe edilir.

-Falkondaki tüm sıvı çekilerek flaska aktarılır.

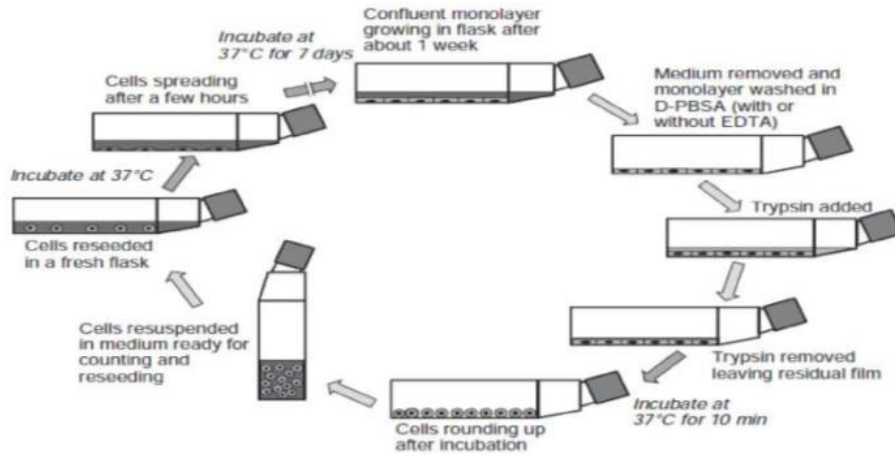
-Dondurma işlemi için pasajlamadaki santrifüj sonrası çeperdeki pelletin üzerine besiyeri değil dondurma solüsyonu eklenir.

-Dondurma solüsyonu 10ml'lik stok olarak hazırlanır. %70 Besiyeri, %20 FBS ve %10 DMSO içerir.

-Dondurma solüsyonu hücrelerin üzerine eklenir ve sıvı kriyotüpe alınır.

-Sonrasında kriyotüp kademeli olarak dondurulur. 15-20 dk -20 derecede sonra overnight -80 derecede bekletilir ve son olarak -196 derece azot tankına yerleştirilir.

***Kullanılan flasklar, ependorflar, kriyotüpler her zaman öncelikle etiketlenmelidir.



11.HAFTA: Hücre Canlılık Testleri ve Sonuçlarının Analizi (Teorik – Örnek MTT Gösterimi), Hücre Ölümü ve Apoptoz Tayini / DAPI Boyama ve Floresan Mikroskopta Görüntüleme

Toksisite, bir kimyasalın canlı bir organizmada olumsuz bir etki yaratma potansiyelidir. Yani bir maddenin bir organizmaya zarar verme derecesidir. Hayvan, bakteri veya bitki gibi bütün bir organizma üzerindeki etkinin yanı sıra tek bir hücre veya bir organ gibi organizmanın bir alt yapısı üzerindeki etkiyi de ifade edebilir.

Sitotoksisite, maddelerin veya çevresel değişikliklerin hücre sağlığı üzerindeki zararlı etkilerini tanımlayan genel bir terimdir. Hücrelerin sitotoksik bir uyarana maruz kalması metabolik aktiviteyi tehlikeye atabilir, hücre büyümesini veya bölünmesini engelleyebilir veya nihayetinde hücre ölümüne neden olabilir. Hücrelerin canlılık seviyeleri ve / veya proliferasyon oranları hücrenin sağlıklı olduğunun en önemli göstergeleridir. Fiziksel ve kimyasal ajanlar hücre sağlığını ve metabolizmasını etkileyebilir. Bu ajanlar, farklı mekanizmalar aracılığıyla hücreler üzerinde toksisiteye neden olabilir;

- hücre zarlarının tahrip edilmesi,
- protein sentezinin önlenmesi,
- reseptörlere geri dönüşümsüz bağlanma,
- DNA sentezinin önlenmesi

Hücre Canlılığı ve Toksisite Testleri:

Kültürlenmiş hücreler üzerinde yapılan in vitro sitotoksisite testleri kimyasalların sitotoksisite testleri ve ilaç taraması için yaygın olarak kullanılmaktadır. Şu anda bu testler, ilaç geliştirme sırasında hem bileşik toksisitesini hem de tümör hücresi büyüme inhibisyonunu değerlendirmek için onkolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır.

Hücrel toksisitenin değerlendirilmesi için hedef noktaları:

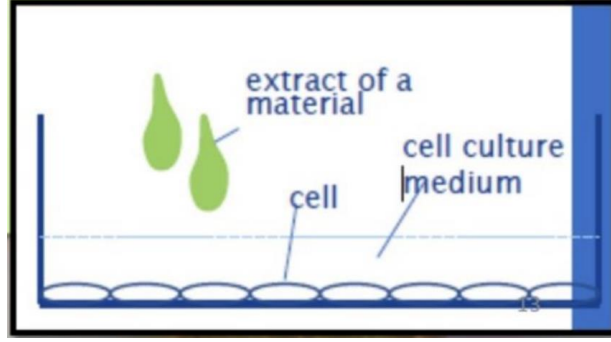
- Hücre morfolojisi**; Kabarcıklanma, vakuolizasyon, ince yapısal değişiklik
- Hücre canlılığı**; tripan mavisi (ölü hücreye girer), nötr kırmızı (canlı hücreler tarafından aktif olarak alınır), Cr 51 serbest bırakılması
- Hücre büyümesi**; hücre sayımı, DNA veya protein içeriği, glikoz tüketimi, laktat üretimi, NR testi, MTT testi
- Metabolik parametreler**; O₂ tüketimi ya da ATP seviyesi, DNA ve RNA öncüllerinin seviyesi, NADH-NAD dönüşümü

Sitotoksisite nitel ve nicel yollarla değerlendirilir.

A) Nitel Sitotoksisite Testleri: Test edilecek solüsyon ya da malzeme 24-72 saat aralığında hücreler üzerinde uygulanarak toksisitesi incelenir.

Yaygın olarak kullanılan farklı nitel sitotoksisite testleri;

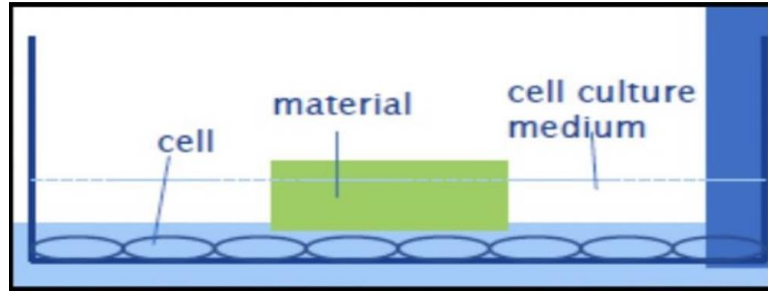
1)Ekstraksiyon yöntemi/ MEM Elüsyon: Test materyali uygun bir besiyerinin içerisinde 24 saat boyunca ekstrakte edilir. Ekstrakt kültürlenmiş hücrelerin üzerine aktarılır. Hücrelerin yapısındaki değişiklikler, hücre dejenerasyonu veya hücre lizisi mikroskopik olarak gözlemlenir.



2)Agar Difüzyon ya da Agaroz Kaplama Testi: Kültürdeki hücrelerin üzerine besin ile desteklenmiş ince tabaka bir agar konulur. Test materyali bu agarın üzerine yerleştirilir. Agarda test materyalinin etrafında meydana gelen zonların varlığına göre toksisite belirlenmiş olur.

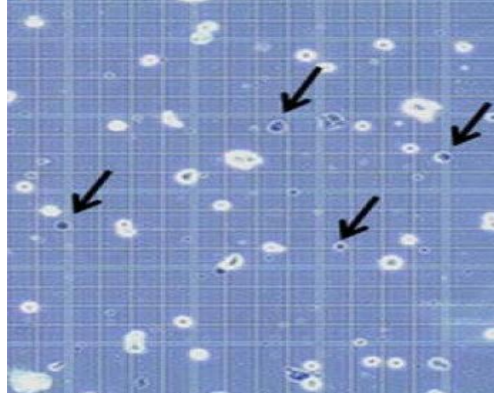


3)Direkt Temas Methodu: Bu yöntemde test materyali herhangi bir agar tabakası kullanılmadan direkt olarak hücreler üzerine uygulanır. Materyalden ortama yayılan bileşenlerin toksik etki gösterip göstermediği mikroskopik analiz sonrası belirlenir.



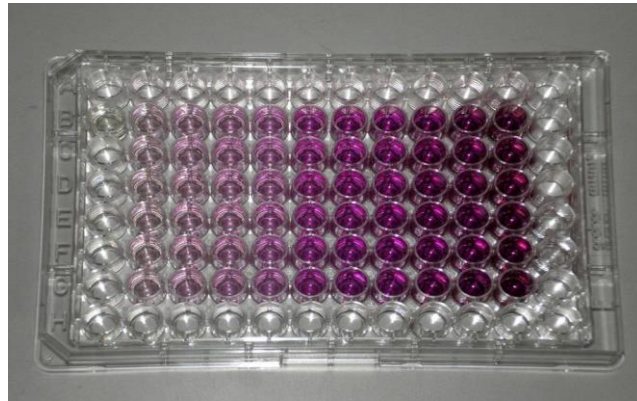
B) Nicel Sitotoksosite Testleri:

1)Boya dışlama yöntemi: En basit ve yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri boya dışlama yöntemidir. Boya dışlama yönteminde, canlı hücreler boyaları hücre içerisine almazken, ölü hücreler bunları hücre içerisine alır. Boya dışlama yöntemi ile membran bütünlüğünün belirlenmesi mümkündür. Eozin, Kongo kırmızısı, eritrosin B ve tripan mavisi gibi çeşitli boyalar kullanılmıştır. Hücre kültüründe ismi geçen boyalar içerisinde en sık kullanılan boya tripan mavisidir. Tripan mavi boya dışlama testi, canlı hücrelerin bu boyayı sağlam hücre zarlarına sahip olduğu için tutmaması, ancak ölü hücrelerin tutması prensibine dayanır. Canlı hücreler şeffaf parlak bir sitoplazmaya sahipken, ölü hücreler mavi bir sitoplazmaya sahip olacaktır.

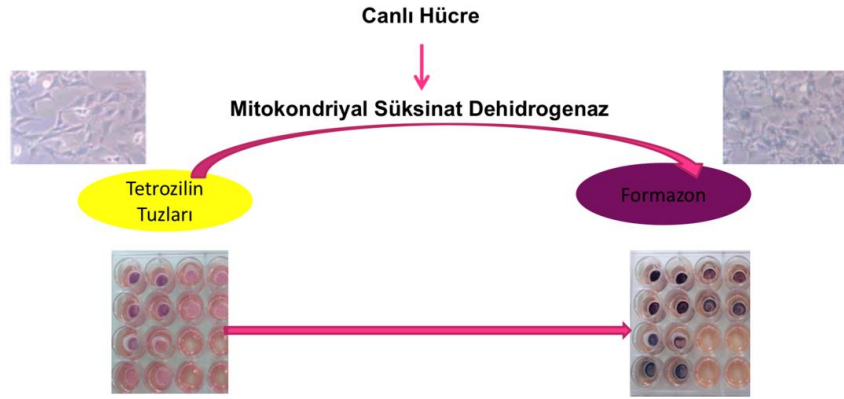


2) Kolorimetrik Testler: Kolorimetrik testlerin prensibi, hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmek için biyokimyasal bir markerin ölçümüdür. Kolorimetrik deneylerde kullanılan reaktifler, hücrelerin canlılığına yanıt olarak bir renk geliştirir ve spektrofotometre ile kolorimetrik ölçüm yapılarak hücre canlılığı tespit edilir. Kolorimetrik analizler konfluent veya süspansiyon hücre hatları için uygulanabilir, kolay uygulanır ve nispeten ekonomiktir.

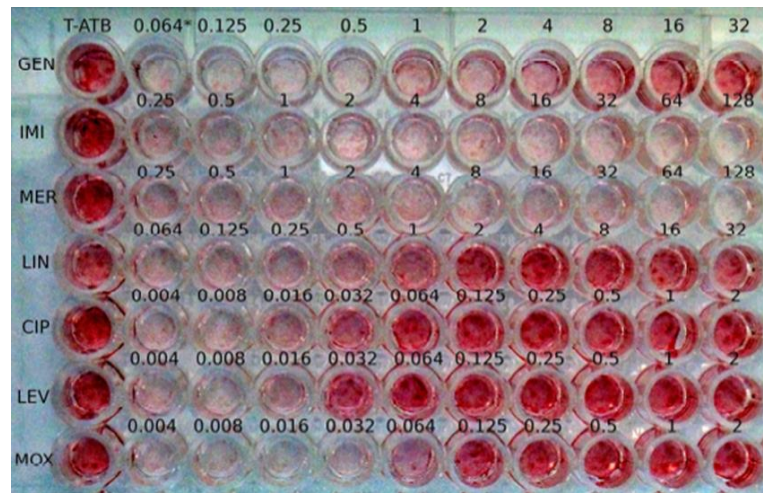
- **MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide):** Hücre proliferasyon ve canlılık testi, hücre çoğalması ve canlılığını in vitro ortamda hassas bir şekilde belirleme testidir. Hücreler düz zeminli 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında üretildikten sonra tetrazolium bileşiği olan MTT hücreler üzerine eklenip inkübe edilir. Sarı renkli MTT, mor renkli çözünmeyen formazana indirgenir. Bu indirgenme yalnızca mitokondriyal redüktaz enzimi varlığında gerçekleştiği için formazanın oluşum miktarı ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Daha sonra DMSO solüsyonunun ortama eklenmesi ile formazan kristalleri çözünür ve spektrofotometrik olarak okunur.



Deneyin Prensibi

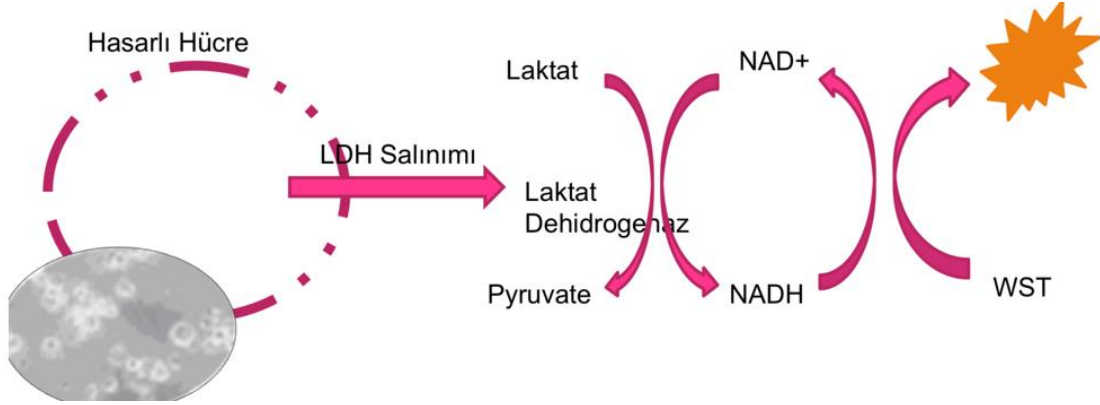


- **Calcein Testi:** Calcein bileşeninin aseto-metoksi türevi hücre canlılığında kullanılır. Bu boya canlı hücrelere girdiğinde esteraz enzimleri tarafından aseto-metoksi grupları uzaklaştırılır. Hücre içerisinde kalan Calcein güçlü bir floresans ışımaya yapar. Ölü hücrelerde esteraz bulunmadığından yalnızca canlı hücreler boyayla etiketlenir ve flow sitometriyle canlılık oranları belirlenir.
- **Nötral Kırmızı Testi:** Lizozomal aktiviteyi ve membran geçirgenliğini gösterir. Bu boya nötral bir boyadır ve hücre membranında non-iyonik difüzyon yardımıyla geçmektedir. Canlı hücrelerin lizozomlarında birikir ve anyonik bileşenlere bağlanır. Hücrelerin nötral kırmızı boya alımı, hücrelerin ATP üretimi yoluyla pH gradyanlarını koruma kapasitesine bağlıdır. Fizyolojik pH'da boyanın net yükü sıfırdır. Bu yük, boyanın hücre membranından penetre olmasını sağlar. Lizozomların içinde, sitoplazmanınkinden daha düşük bir pH'ı sağlamak için bir proton gradyanı vardır. Böylece, boya pozitif yüklenir ve lizozomların içinde tutulur. Hücre öldüğünde veya pH gradyanı azaldığında, boya tutulamaz ve hücre dışına salınır. Bu nedenle, canlı hücreler NR boyasını aldıkları için canlı ve hasarlı/ ölü hücreler arasında ayırım yapmak mümkündür, hasarlı veya ölü hücreler boyayı içine almazlar. Düşük bir sitotoksik etki olduğunda canlı hücrelerin içerisinde biriken NR boyası sayesinde lizozomların mikroskopik olarak genişlemesi tespit edilebilir.



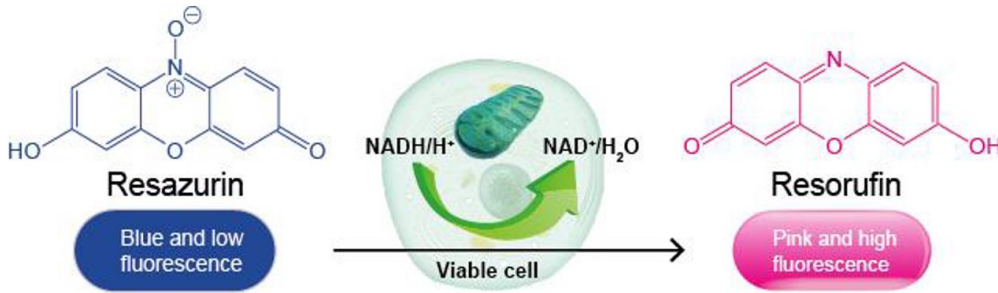
- **LDH (Laktat Dehidrojenaz):** Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir metot ise hasarlı/ölü hücrelerden ortama salınan laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin belirlenmesidir. Laktat dehidrojenaz, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH

enzimi hücrelerden sızarak ortama geçer. Böylece maruziyet sonrası LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilir.



3) Florometrik Testler: Hücre canlılığı ve sitotoksite florometrik analizleri, bir floresan mikroskop, florometre, floresan mikroparka okuyucu veya akış sitometresi kullanılarak kolayca gerçekleştirilebilir ve geleneksel boya dışlama ve kolorimetrik analizlere göre birçok avantaj sunar. Florometrik analizler monolayer veya süspansiyon hücre hatları için geçerlidir ve kullanımı kolaydır. Bu testler kolorimetrik testlerden daha duyarlıdır.

- **AlamarBlue (AB) Testi;** Alamar Blue testi, mitokondriyal enzimler ve diaforaz gibi diğer enzimler tarafından mavi non-floresan bir boya olan resazurinin pembe floresan resorufine dönüştürülmesi prensibine dayanmaktadır. Resazurinin rengi mavidir ve floresan değildir. Hücrelere girdikten sonra resazurin resorufine indirgenir. Resorufin kırmızı renktedir ve yüksek derecede floresan özelliktedir. Canlı hücreler, sürekli resazurini resorufine dönüştürür ve hücre kültürü ortamının genel floresanını ve rengini artırır. Üretilen resorufin miktarı, canlı hücre sayısı ile ilişkilendirilir.



!! Bu kısma kadar olan testlerde hücre canlılığının olup olmadığı kontrol edilebilir ancak apoptoz tayini için yeterli değildir. Apoptoz-nekroz farkını anlayabilmemiz için bu iki tanımları detaylı inceleyeceğiz.

Apoptoz (Programlı hücre ölümü)

Normal fizyolojik şartlarda, hasarlı veya yaşlı hücreler apoptoz olarak adlandırılan ve genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla kendi kendilerini öldürür. Apoptoz birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynar. Apoptoz, hücre hacminin küçülmesi ile başlar; hücre büzülür, membranda küçük balonlaşmalar olur; nükleus yoğunlaşarak nükleer membrana yarım ay biçiminde çöker; sonraki

aşamada kromatin parçalanır. Parçalanmış kromatin içeriğini saran sitoplazmik tomurcuklar (kabarıkçıklar) oluşur. Hücre apoptotik cisimcikler oluşturmak üzere yıkıma gider. Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından fagosite edilir, bu nedenle inflamasyon görülmez. Membranda ve sitoplazmik organellerdeki bütünlük sonuna kadar korunur. Apoptoz diğer bir ölüm şekli olan nekrozdan farklıdır. Nekroz ölümü, hücrenin razı olmadığı pasif bir olaydır. Apoptoz ise, hücrenin kendisini öldürmeye karar verdiği ve bunun için çok sayıda yeni protein sentezlerine yöneldiği aktif ve mutlak enerji kullanılan dinamik bir süreçtir. Nekrozda hücrede mitokondri ve golgi kompleksi gibi önemli organellerde şişme, hücre membranında bütünlüğün kaybolması öncelikle dikkati çeker. Nekrotik hücreler parçalanır; sitoplazma ve çekirdek içeriği çevreye salınır. Bu durum inflamasyonu tetikler.

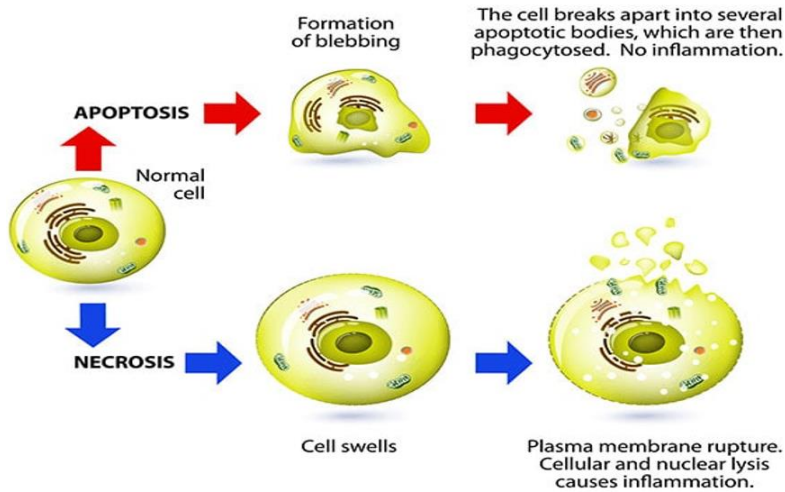
Apoptotik hücrede görülen morfolojik değişiklikler

- Hücrede büzüşmenin ve nükleusta yer yer kromatin yoğunlaşmasının başlaması;
- Hücre membranında baloncukların oluşması; Nükleusta kromatinin yarım ay biçiminde yoğunlaşması
- Kromatin yoğunlaşması
- Nükleusun küçük parçalara ayrılması
- Apoptotik cisimciklerin oluşumu.

Apoptozda birbirini izleyen dört basamak vardır;

- 1)Hücre dışı ve hücre içi faktörlerin uyardığı hücre ölümü için hücrenin kendini programlaması
- 2)Kaspazlar (sistein-aspartik asit-spesifik proteaz) olarak adlandırılan hücre içi proteazların aktivasyonu ile hücre ölümü
- 3)Oluşan apoptotik cisimciklerin makrofajlar tarafından fagositozu
- 4)Apoptotik cisimciklerin lizozomal yıkılması

Apoptoz ve Nekroz



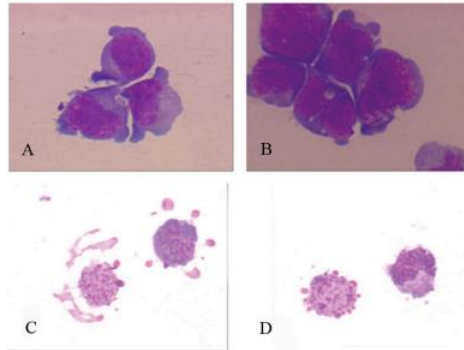
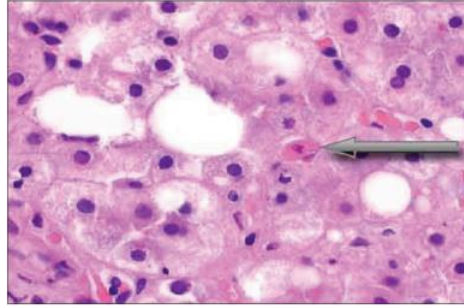
Apoptoz saptanmasında kullanılan yöntemler:

- **Morfolojik görüntüleme yöntemleri;**

Işık Mikroskobu ile;

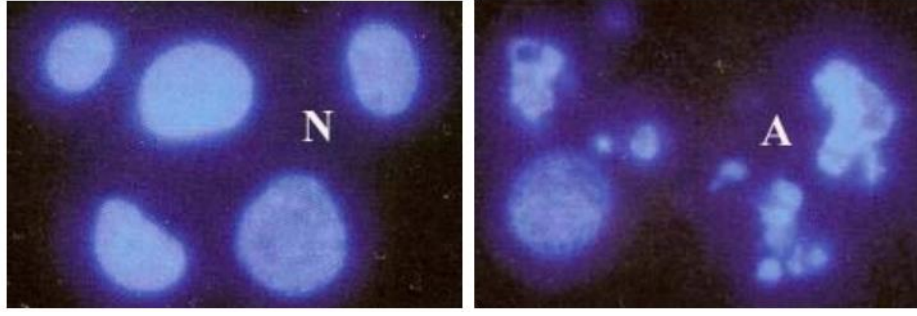
-Hematoksilen-eozin boyama; Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi.

- **Giemsa boyama;** Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur.

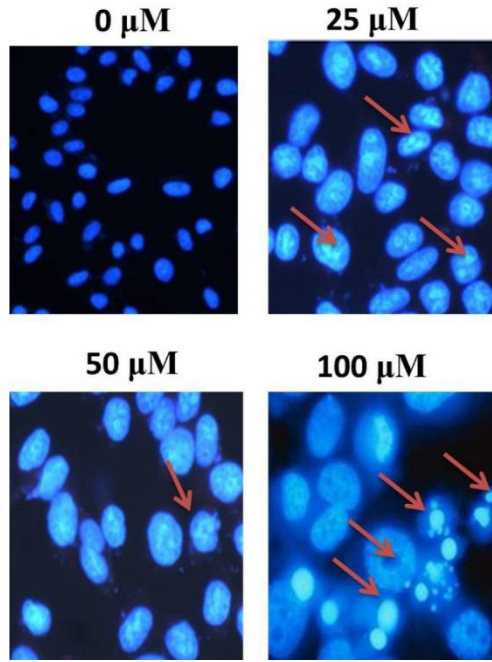


Florasan mikroskobu ile;

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn. **Hoechst boyası**, **DAPI** “4,6-diamidine-2’-phenylindole”, **propidium iyodür**, akridin orange, etidyum bromür, FITC “fluorescein isothiocyanate”) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA’ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelebilir. Hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin kondensasyonu veya nukleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür.

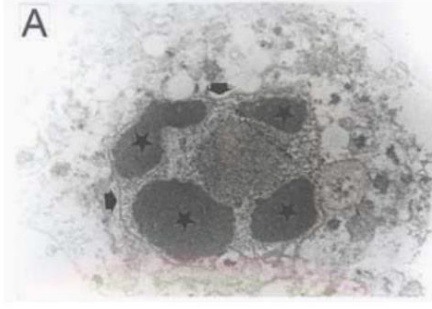


DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) nükleer değişiklikleri görselleştirmek ve apoptozu değerlendirmek için kullanılabilen bir floresan boyadır. DAPI, DNA'nın adenin-timin bölgelerinin küçük oluşuna güçlü ve seçici bir şekilde bağlanır ve çift sarmallı DNA'ya bağlandığında 359 nm'de ışığı emip 461 nm'de (mavi floresan) yayar. DNA'ya bağlı olan DAPI, bağlı olmayan DAP'ıninkinden yaklaşık 20 kat daha yüksek bir floresans yoğunluğuna sahiptir ve floresans ışımaya miktarı mevcut DNA miktarı ile de doğru orantılıdır. Dolayısıyla apoptotik hücre zarı tehlikeye girdiğinde, hücreye daha fazla DAPI girer ve hücreyi daha güçlü bir mavi renge boyar. Böylece fark nükleer morfolojiye sahip olan apoptotik hücrelerin DAPI ile boyanarak görsel olarak tanımlanması sağlanır.

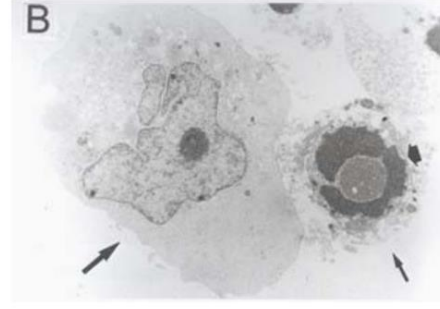


Elektronmikroskobu ile;

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmantasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subcellüler detaylar da incelenebilir.



Nukleus fragmentasyonu



Solda normal bir hücre görülmektedir. Sağdaki apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir

- **Histokimyasal yöntemler**

Anneksin V yöntemi;

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. AnneksinV, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidium iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITCPI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir.

TUNEL yöntemi;

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır.

Kaspaz-3 yöntemi;

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3’ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler.

- **Biyokimyasal yöntemler**

Western Blotting;

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir. Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrenin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır.

- **İmmunolojik yöntemler**

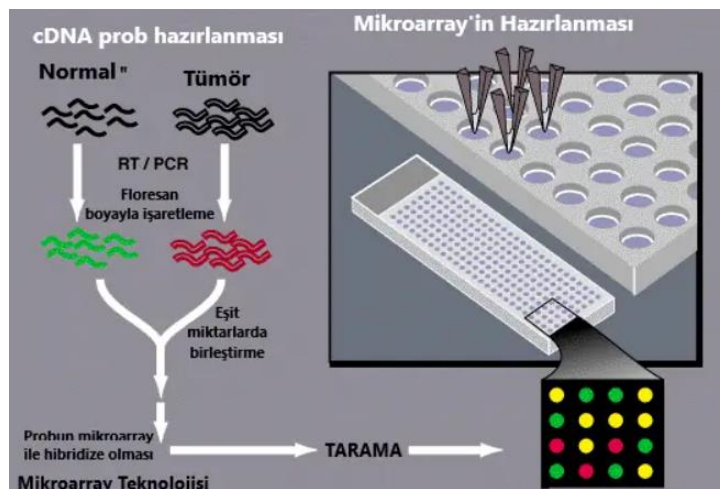
ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay);

ELISA testi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir. ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur. ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. ELISA analizinde, ELISA pleytlerindeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için iki nükleozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor kullanılır. Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptotik DNA merdiveninin belirlenmesinden yaklaşık 500 kat daha fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygundur.

- **Moleküler biyoloji yöntemleri**

DNA mikroarray ile;

Hücrede apoptoz ile ilgili gen ifade değişimleri belirlenir (örneğin kaspazlar). Mikroarrayler, belirli genlerin hücrelerde ve dokularda ne ölçüde açılıp kapatıldığını incelemek için kullanılır.



MATERYAL-METOT:

MTT Testi;

Cihazlar ve Malzemeler: 96'lı well plate, MTT solüsyonu, DMSO, mikropipet, falkon tüpler, Spektrofotometre cihazı, Ökaryotik hücre hattı, Flasklar, Besiyeri, PBS, ependorf tüpleri.

Metot:

- Deneye başlamadan önce MTT 0,5 mg/mL olacak şekilde PBS içerisinde çözündürülür. Daha sonra solüsyonu içeren falkon solüsyonu ışıktan korumak için alüminyum folyo ile kaplanır.
- MTT yapılacak hücrelerin sayımı gerçekleştirilir ve besiyeri ile kuyulara eklenecek hücre konsantrasyonu kadar stok hazırlanır. Daha sonra 96-well platede her kuyuya 100 µL olacak şekilde hücreler dağıtılır.
- Hücreler eklendikten sonra plate overnight inkübasyona bırakılır.
- Ertesi gün kuyulardaki tüm besiyeri uzaklaştırılır. Daha sonra etkinliği ölçülmek istenen ve besiyeri ile seyreltilerek farklı konsantrasyonları hazırlanan ajan kuyulara 100 µL olacak şekilde dağıtılır. Plate tekrar overnight inkübasyona bırakılır.
- Bir sonraki gün kuyulara daha önceden hazırlanan MTT solüsyonu 10 µL olacak şekilde eklenir ve plate 4 saat inkübatörde bekletilir.
- Sürenin sonunda kuyulardaki tüm medium uzaklaştırılır ve kuyulara 100 µL DMSO eklenir ve spektrofotometrede 570 nm'de ölçüm alınır.

DAPI Boyama;

Cihazlar ve Malzemeler: 6'lı well-plate, inkübatör, mikropipet, besiyeri, ökaryotik hücre hattı, floresan mikroskopu, DAPI boyası

Metot:

- 6 kuyucuklu well platalere belirlenen konsantrasyonlarda hücreler ekilir ve üzerine 2 mL besiyeri eklenerek overnight inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası hücreler üzerine belirlenen değerlerde etkin ajan eklenir ve uygulama sonucunda hücreler 48 saat inkübe edilir.
- Sonrasında DAPI boyası örnek içeren kuyulara karanlıkta uygulanır.
- Spesifik substratlara bağlanabilmesi için yaklaşık 10 dk kadar karanlıkta inkübatörde bekletilir.
- Hücreler ışık ve floresan mikroskopunda 10X ve 20X büyütme ile incelenir ve apoptotik hücre sayısı hesaplanır.

12.HAFTA: Hücre Canlılık Testleri, Hücre Ölümü ve Apoptoz Tayini / DAPI Boyama ve Floresan Mikroskopta Görüntüleme

Preparat Hazırlama

Mikroskopta incelenmeye hazır hale getirilmiş numuneye “preparat” denir. Preparata boyama işlemi yapılırsa bunlar boyalı preparat olarak belirtilir. Mikroskopik inceleme amacı ile şüpheli kültürlerden veya marazi maddelerden (organlardan, patolojik sıvılardan, kandan, idrar, gaita, sperma, süt vb.) preparatlar hazırlanır. Lamın üstüne kültür veya numuneden konulup lamel kapatılarak yayma, kurutma, fikse etme gibi işlemler yapılarak preparat hazırlanır.

Preparat hazırlamada kullanılacak lamaların kalitesi (şeffaflığı, yüzeylerinin çiziksiz olması, kenarlarının ve ölçülerinin düzgünlüğü, kalınlığının homojenliği ve camın sağlamlığı) ve temizliği son derece önemlidir. Lam üzerinde bulunan çok küçük bir leke, toz, kalıntı veya çizik mikroskopta yanlış algılamalara neden olabilir ve görüntünün net olarak görülmesini engelleyebilir. Preparat hazırlamada kullanılacak lam, ksilol veya etil alkolle ıslatılarak temiz bir bezle silinip alevden geçirilir ve aşağıdaki aşamalar takip edilerek preparat hazırlanır.

Preparatların tespit (fiksasyon) edilmesindeki temel amaç bakterilerin lama yapışmalarını sağlayarak tutturaktır. Bu suretle üzerlerine uygulanacak sıvılarla lamdan ayrılmaz. Tespit işlemi genellikle “ısı uygulama ile tespit” veya “kimyasal maddelerle tespit” olmak üzere iki yöntemle yapılır. Laboratuvarda, bakteriyolojik preparatların tespitinde en sık kullanılan yöntem ısı uygulama ile tespit yöntemidir. Kurutulan preparat, bir ucundan özel pensle tutulup alevden 3-4 defa geçirilerek tespit edilir. Tespit sırasında preparatın yanmamasına dikkat edilir. Yanmış preparatlarda mikroorganizmalar dağılmış, şişmiş ve deforme olmuş bir şekilde görülür. Isı ile bozulabilecek ökaryot hücrelerden ve protein yönünden zengin numunelerden (kan ve dokulardan) yapılan preparatlara kimyasal tespit uygulanır. Kimyasal tespit işlemi etil alkol, metil alkol, alkol-eter, alkol-aseton gibi kimyasal maddeler içerisinde bekletilerek yapılır. Metil alkol de 3-4 dakika, etil alkol de 10 dakika bekletilen preparat çok hafif akan suda yıkanıp kurutulur.

