

Laboratuvar Çalışma Teknikleri

C. SAÇKESEN*, E. BİR BEN*

* Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi, ANKARA

Bu sayıdan itibaren sizlere laboratuvar da sıkça kullanılan bazı yöntemleri basit bir dille, şekiller üzerinden anlatmayı hedefledik. Biliyoruz ki çok sayıda genç araştırmacı allerjik hastalıklarla ilgili laboratuvar araştırmaları yapmayı planlıyor, ama işin neresinden başlayacağını bilemediği için, bir türlü gerekli cesareti toplayarak girişimde bulunamıyor. Bu sayfalardaki bilgilere sizler de internetten, kitaplardan veya makalelerden kolayca ulaşabilirsiniz. Hedefimiz, teknikleri çok basit dille anlatarak anlaşılabilirliğini kolaylaştırmak, bu konularda araştırma projeleri yazmayı planlayan kişilere ne gibi malzemelere gereksinimleri olduğunu göstermek ve laboratuvar da hangi demirbaşların mutlaka bulunması gerektiğini anlatmak. Bu sayıda tam kandan mononükleer hücre ayırma tekniği anlatılacaktır. Daha sonraki sayılarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), PCR-RFLP, RT-PCR, RNA izolasyonu, klonlama, DNA sekansı, ELISA, akım sitometri hakkında bilgi verilecektir.

PERİFERİK KANDAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU

-* Venöz kan heparinize bir tüp veya enjektör içine alınır.

-* 50 mL'lik falkon içine heparinize kan boşaltılır, üzerine aynı volümde "phosphate buffer solution (PBS)" veya RPMI eklenir.

-* PBS ile sulandırılan kan pipet ile üç-dört kez (çekip-verme) karıştırılır.

-* Üzerine kan ile aynı volümde olmak üzere ficoll (Sigma 1077) tüpün yan duvarından çok yavaşça sızdırılarak bırakılır. Yoğunluğu yüksek bir sıvı olduğu için hemen dipte birikir.

Örneğin; 15 cc heparinize kan + 15 cc PBS ve sonra 15 cc ficoll ilave edilir.

- Tüpler hiç karıştırmadan ve sarsmadan santrifüje konur (20 dakika, 2300 rpm, 4°C).

- Santrifüj sonrasında en altta eritrositler çöker, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu yüksek olan ficoll ve en yukarıda PBS ve plazma vardır. Ficoll ve PBS birleşim yerinde bir bulut şeklinde mononükleer hücreler yer almaktadır. Pastör pipeti ile sıvının içine girilerek mononükleer hücreler toplanır.

- Toplanan mononükleer hücreler yeni bir 50 mL'lik falkonda toplanır (yaklaşık 10-15 cc),

Yazışma Adresi: Dr. C. SAÇKESEN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Allerji ve Astım Ünitesi, 06100 ANKARA

e-posta: csackesen@yahoo.com

üzerine PBS doldurulur ve 10 dakika 2000 rpm 4-8°C'de santrifüj edilir.

- Mononükleer hücreler falkonun dibine çöker, üzerindeki PBS döküldükten sonra falkonun dibindeki hücreler tüpe hafifçe vurarak kaldırılır. İçinde kalmış olası eritrositleri lizis etmek üzere 500-1000 µL distile su konur, 1000'lik pipet ile hücreler (çekme-verme ile) karıştırılır. Otuz saniye distile su ile inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerine tekrar PBS konur ve beş dakika 1300 rpm 4-8°C'de santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrasında hücreler falkonun dibinde çökmüştür. Üzerindeki PBS dökülür, 10 cc (fetal bovine serum ve antibiyotik içeren RPMI) tam medium ile hücreler sulandırılır ve Trypan blue boyası ile (1 hacim boya + 1 hacim hücre) boyanır. Mikroskopta Neubaheuer lamda hücreler sayılır. Toplam hücre= Sayılan hücre x Dilüsyon faktörü x Toplam hacim x 10.000 (lam faktörü).

- Trypan blue boyasını alan hücreler mavi renkte ve ölü hücrelerdir, mikroskopta boya almayan canlı hücreler sayılır.

Örneğin; hücreler 10 mL tam mediumda sulandırıldı, boyamada 1 hacim Trypan blue ve 1 hacim hücre kondu ve mikroskopta 450 hücre sayıldı.

Toplam hücre sayısı = 450 x 10 x 2 x 10.000 = 90 x 10⁶

Hücre kültür deneyleri için koşullar hazırlanırken hücreler buzda bekletilir.

Tüm hücre izolasyon ve kültür deneyleri steril koşulları sağlamak amacıyla laminar akımda yapılmalıdır. Ayrıca, hücre kültür plağına yerleştirilen hücreler 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem ortamı veren inkübatörde deney koşulları boyunca saklanmaktadır.

İlk üç basamakta yıldız ile işaretlenen işlemler özel filtreli tüplerde yapıldığı takdirde hücre toplama işlemine gereksinim olmaz. Şekil 1'de filtreli lökoseparasyon tüpü kullanılarak yapılan işlem gösterilmiştir.

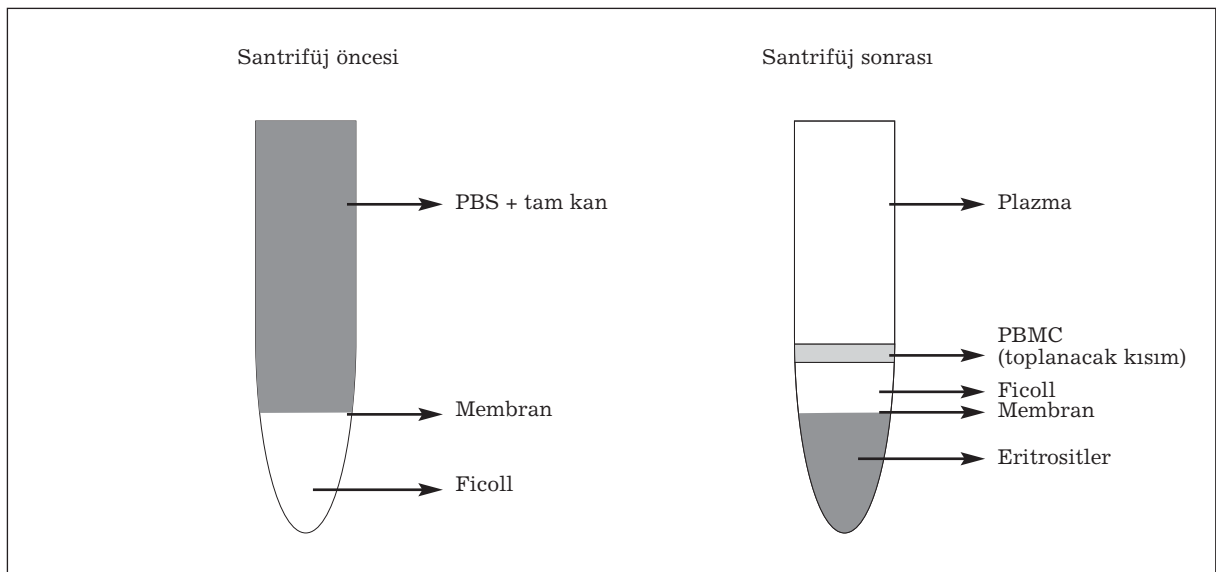
Eğer elinizde bu tüplerden varsa, izlemeniz gereken yol aşağıda belirtildiği şekilde olacaktır:

- Önce tüpe 15 mL ficoll konur, bir dakika 1200 rpm'de santrifüj edilir, böylece ficoll filtresinin altına geçer.

- 15 mL kan + 15 mL PBS karışımı tüpün içine konur ve 20 dakika 2300 rpm 4°C'de santrifüj edilir.

- Santrifüj sonrası eritrositler membranın altına geçer, üstte ise ficoll, PBS ve mononükleer hücreler vardır. Tüp boş bir falkona ters yüz edildiğinde sadece üst kısım boşalır, eritrositler ise tüpte kalır. Böylece ficoll yayma ve hücre toplama işlemlerini yapmanıza gerek kalmaz.

Laboratuvarda çalışmaya hevesli arkadaşlara kolay gelsin.



Şekil 1. Filtreli lökoseparasyon tüpü kullanılarak yapılan işlem.