

2. Solüsyon 0.22 µm'lik filtre kullanılarak filtre edilir ve 20µl olacak şekilde alikotlanır.
3. Alikotlar -20°C' de saklanmalı ve çözüldükten hemen sonra kullanılmalıdır.

#### 2.4. Primer Antikor Hazırlanması

Liyofilize antkor 2 ml hücre kültürüne uygun suda çözülerek hemen 0.5 ml' lik konik tüplere alikotlanır ve -20°C' de saklanır.

#### 2.5. Guinea Pig Komplement Hazırlanması

Liyofilize komplement 1 ml hücre kültürüne uygunsuda çözülür ve hemen 0.5 ml'lik tüplere her tüpte 60 µl olacak şekilde alikotlanarak -20°C'de saklanır.

#### 2.6. Kültür Ortamı Hazırlanması

Destek hücreleri ve embriyonik kök hücre kültüründe kullanılan kültür ortamı hazırlanışı sırasında önerilen oranlar **Tablo 1'** de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Destek hücreleri ve embriyonik kök hücreleri için kullanılan kültür ortamı hazırlanışı

Solüsyonlar	Destek Hücre Kültür Ortamı	hES Kültür Ortamı
DMEM (*)	458.5ml	404.5ml
FBS (*)	50ml	75ml
Penisilin/streptomisin (100X)	5ml	5ml
L-Glutamine-200mM(*) (Günlük)	5ml	5ml
Nonesans. Aminoasit solüsyonu (100X),NEAA		5ml
ITS 100X(*) (Günlük)		5ml
β-ME(*)	500µl	500µl
<b>Total Hacim</b>	<b>500ml</b>	<b>500ml</b>

(\*) Kök hücre kültür ortamında DMEM olarak *Ko-DMEM*, FBS kaynağı olarak kök hücrede test edilmiş FBS (Hyclone) kullanılmaktadır. Stok olarak hazırlanan kültür ortamları 50 ml'lik konik falkon tüplere bölünerek +4°C'de saklanır ve 2 hafta içinde tüketilmelidir.

Hazırlanan kültür ortamlarına kullanım öncesi, günlük olarak 1/100 oranında L-Glutamin (200 mM) eklenir.

İnsülin-transferin-selenyum (ITS) ise günlük olarak sadece hES kültür ortamına konmaktadır.

Bunun yanında kültür ortamı hazırlığı sırasında kullanılan β-ME solüsyonunun daha önceden çalışma solüsyonu olarak hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla kültür ortamı hazırlığı öncesi 70 µl 14.3 M β-ME 10 ml PBS(Ca-mg free) ile seyreltilir ve tüplere bölünerek -20°C 'de saklanır.