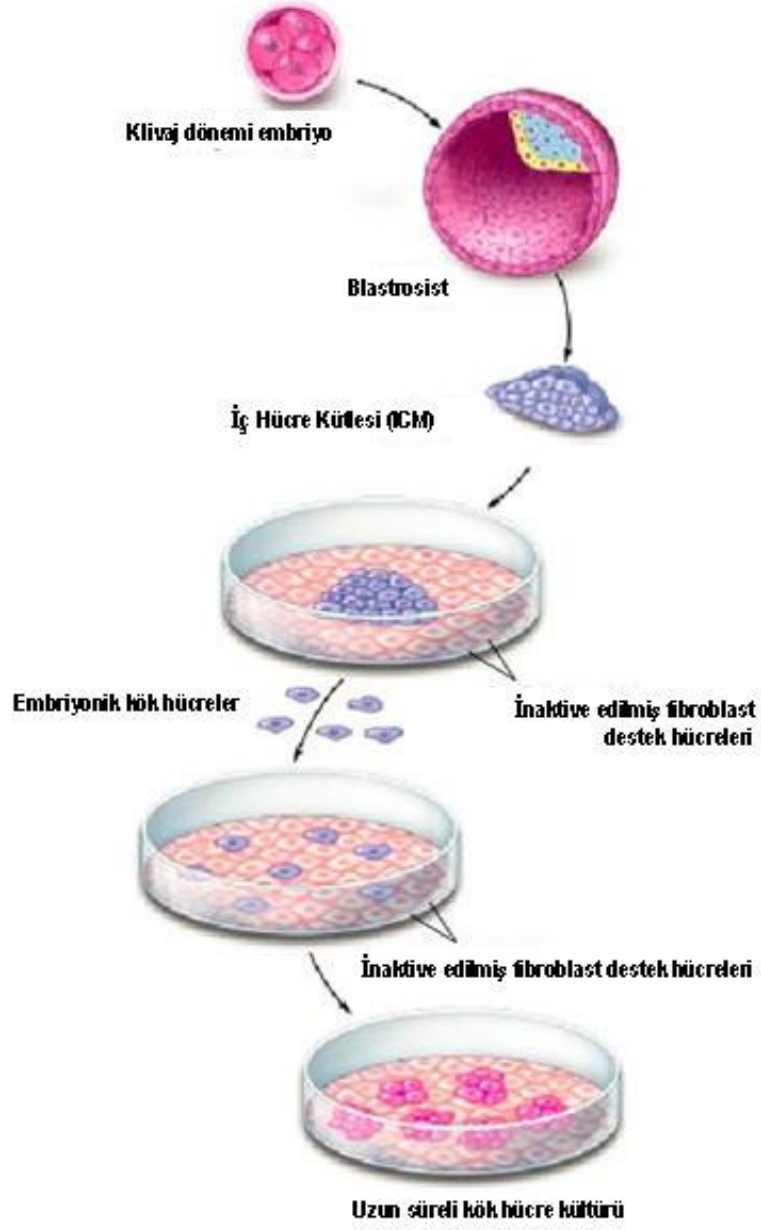


## EMBRİYONİK KÖK HÜCRE İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜ



## ***İçindekiler***

---

<b>Giriş</b>	<b>4</b>
<b>1. Gerekli Kimyasallar ve Materyaller</b>	<b>4</b>
1.1. Kök Hücre Kültürü Amaçlı Kullanılan Plastik ve Cam malzemeler	4
1.2. Kök Hücre Kültür Ortamı Hazırlığında Kullanılan Solüsyon ve Kimyasal Maddeler	5
1.3. Laboratuvarda Bulunması Gereken Ekipmanlar	5
<b>2. Solüsyon ve Kültür Ortamı Hazırlanışı</b>	<b>6</b>
2.1. 0.1% Jelatin Solüsyonu Hazırlanması	6
2.2. EGTA Solüsyonu Hazırlanması	6
2.3. bFGF Solüsyonu Hazırlanması	7
2.4. Primer Antikor Hazırlanması	7
2.5. Guinea Pig Komplement Hazırlanması	7
2.6. Kültür Ortamı Hazırlanması	7
2.7. Mitomisin-C Stok Solüsyonu Hazırlanması	8
2.8. %0.05' lik Tripsin/EDTA Solüsyonunu Hazırlanması	8
2.9. Vitrifikasyon ve Çözme Solüsyonlarının Hazırlanması	8
<b>3. Protokoller</b>	<b>10</b>
3.1. Destek Hücre Amaçlı Fare Embriyonik Fibroblast Hücrelerinin (mEF) İzolasyonu	10
a) <i>Fare embriyonik fibroblast hücrelerinin dondurulması ve çözülmesi</i>	11
3.2. Destek Hücreleri Olarak Endometrial Hücrelerin İzolasyonu1	12
a) <i>Stromal hücre izolasyonu</i>	12
b) <i>Glandular hücre izolasyonu</i>	12
3.3. Destek Hücreleri Olarak İnsan Sünnet Derisinden Fibroblast Hücreleri İzolasyonu	13
3.4. Destek Dokusuyla Kaplanmış Platlerin Hazırlanışı	13
a) <i>Fibroblast hücrelerinin inaktivasyonu</i>	13
b) <i>Destek hücreleri sayımı</i>	14
3.5. İnsan Embriyonik Kök Hücre İzolasyonu	14
a) <i>Pronase uygulaması ile blastosist aşamasındaki embriyolardan zona pelusida katmanının uzaklaştırılması</i>	15
b) <i>Immunosurgery yöntemi kullanılarak blastosist aşamasındaki embriyodan iç hücre kütlesi izolasyonu</i>	16
3.6. Embriyonik Kök Hücrelerin Uzun Süreli Kültürleri (Pasajlama)	17
3.7. Embriyonik Kök Hücre Dondurma/Çözme İşlemleri	18
<b>4. Embriyonik Kök Hücre Tanımlaması Yapılırken Uygulanan Protokoller</b>	<b>18</b>
4.1. Karyotip Analizi	19
4.2. İmmunohistokimya	19
4.3. Farklılaşmış/Farklılaşmamış Kök Hücrelerin Floresan Boyama Tekniğiyle Analizi	20
a) <i>Kök Hücrelerden Embrioid Body Oluşturulması</i>	20
b) <i>Floresan Boyama</i>	21

## **Embriyonik Kök hücre Laboratuvarında uyulması gereken kurallar**

- Embriyonik kök hücreler ile çalışırken genel hücre kültürü teknikleri kurallarına uyulmalıdır.
- Uygulanacak tüm protokoller ve işlemler steril/aseptik teknikler kullanılarak laminar air flow altında gerçekleştirilmelidir.
- Hücreler ile çalışılan tüm materyalin kullanımı veya teması öncesi mutlaka eldiven giyilmelidir.
- İşlem ncesi ve sonrası tüm çalışma alanı (Laminar air flow yüzeyi, mikroskop tablası vb.) %70'lik etil alkol ile silinmelidir.
- Ayrıca laminar air flow içerisine alınacak her türlü kimyasal ajan veya kültür ortamı içeren şişe, tp vb. maddeler işlem öncesi %70'lik etil alkol ile temizlenmelidir.
- Hazırlanan tüm kültür ortamları veya kimyasal ajanlar ilk kullanımları öncesi 0,20 µm'lik filtreden geçirilmelidir.
- Kültür ortamları ve kimyasal ajanlar sadece üretici firma tarafından belirlenmiş zaman aralığında kullanılmalıdır.
- Hazırlanan kültür ortamı karışımlarını içeren tüplerin üzerine mutlaka hazırlanış tarihi, içeriği ve hazırlayan kişinin ismi not edilmelidir.
- Laboratuvarında bulunan tüm cihazların düzenli olarak günlük, haftalık ve aylık kontrolleri yapılmalıdır.
- Laboratuvarında yapılan işler ve uygulanan protokollerin yazılı olduğu bir defter bulundurulmalı, gerçekleştirilen tüm işlemler günlük olarak bu deftere kayıt edilmelidir.

## GİRİŞ

Embriyonik kök hücresi pluripotent olup her üç germ yaprağına ait hücelere farklılaşabilme özelliğine sahiptir. Günümüzde her ne kadar bazı ajanların başkalaşım sürecindeki rolleri bilinse de, dönüşümün çok faktörlü bir mekanizma ile kontrol edilmesi sonucunda ancak belirli oranda istenilen hücre ve doku tipleri elde edilebilmektedir. Yakın gelecekte dönüşüm mekanizmaları ve gerekli olan kimyasal ajanlar veya otokrin/parakrin faktörler daha detaylı belirlendiğinde embriyonik kök hücrelerden istenilen hücre veya doku tipi yüksek oranda ve saflıkta elde edilebilecektir

Bu kısımda, İstanbul Memorial Hastanesi Reprodüktif Endokrinoloji ve Genetik Merkezi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı bünyesinde gerçekleştirilen kök hücre çalışmalarında kullanılan materyaller ve protokoller detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

## 1. GEREKLİ KİMYASALLAR VE MATERYALLER

### 1.1 Kök Hücre Kültürü Amaçlı Kullanılan Plastik ve Cam malzemeler

	<u>Cam ve Plastik Malzemeler</u>	<u>Firma Adı</u>	<u>Katolag Numarası</u>
1	4-kuyucuklu hücre kültürü kabı	Nunc	176740
2	96-kuyucuklu hücre kültürü kabı	Nunc	268152
3	24-kuyucuklu hücre kültür kabı	Nunc	143982
4	6-kuyucuklu hücre kültür kabı	Nunc	152795
5	Kryotüp	Nunc	
6	100-mm hücre kültür kabı	Falkon	353803
7	75 cm <sup>2</sup> hücre kültür flasksı	Falkon	353024
8	25 cm <sup>2</sup> hücre kültür flasksı	Falkon	353014
9	60-mm hücre kültür kabı	Falkon	353802
10	60 mm merkezi kuyucuklu doku kültür kabı	Falkon	353037
11	50 ml vida kapaklı konik tüp	Falkon	352070
12	15 ml vida kapaklı konik tüp	Falkon	352095
13	10 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril)	Falkon	357551
14	5 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril)	Falkon	357543
15	2 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril)	Falkon	357507
16	1 ml filtreli pipet (ayrı ayrı steril)	Falkon	357521
17	35-mm Petri kabı	Falkon	353801
18	100 ul filtreli pipet ucu	Greiner	
19	0,20 um filtre	Sartorius	16534
20	Cam pastör pipeti		

## 1.2. Kök Hücre Kültür Ortamı Hazırlığında Kullanılan Solüsyon ve Kimyasal Maddeler

	<u>Solüsyon&amp;Kimyasallar</u>	<u>Firma Adı</u>	<u>Katalog Numarası</u>
1	Knockout-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Ko-DMEM)	Gibco	10829018
2	Fetal Bovine Serum (FBS; inaktive edilmiş)	Gibco	10106-169
3	200 mM L-Glutamin	Gibco	250030-024
4	Penisilin/Streptomisin (100X)	Gibco	150070
5	DMEM (yüksek glükoz içeren)	Gibco	11960-044
6	Fosfat dengeli salin solüsyonu (D-PBS)	Gibco	14287-080
7	Fosfat dengeli salin solüsyonu (PBS;Ca-Mg-içermeyen)	Gibco	14190-094
8	%0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu	Gibco	25200-056
9	Dispase	Gibco	17105
10	B-Merkaptoetanol (B-ME)	Sigma	M-3148
11	Non-Esansiyel aminoasit solüsyonu (NEAA;100X)	Sigma	M-7145
12	Dimetilsulfoksit (DMSO)	Sigma	D-5879
13	%2'lik Jelatin Solüsyonu	Sigma	G-1393
14	Pronase (Protease)	Sigma	P-8811
15	EGTA	Sigma	E-0396
16	Mitomisin C	Sigma	M-0503
17	Sucrose	Sigma	S-9378
18	HEPES	Sigma	H-7006
19	Collagenase type IV (100 mg)	Sigma	C-5138
20	Fetal Bovine Serum (FBS; kök hücrede test edilmiş)	Hyclone	SH300070.03
21	bFGF (human, recombinant)	Invitrogen	13256-029
22	Guinea Pig Complement	Accurate Chem.	YCC500101
23	LIF (ESGRO)	Chemicon	ESG1106
24	Antibody (desmin)	Chemicon	MAB1698
25	Antibody (troponin I)	Chemicon	MAB3438
25	ESC characterization kit	Chemicon	
27	Secondary Ab (goat-anti mouse)	Santa Cruz	SC-2010
28	Ultra V Block (125 ml)	LabVision	TA-125-UB
29	Colcemide		

## 1.4. Laboratuvarında Bulunması Gereken Ekipmanlar

1	İnkübatör (5%CO <sub>2</sub> , 37°C)	14	Hematositometre
2	Stereo Mikroskop	15	Laminar Air Flow
3	İnvert Mikroskop	16	Şırınga (2,5ml)
4	Aspirasyon sistemi	17	Aliminyum
5	Pipetler, 1ul-1000ul	18	12g ve 18g' lik iğneler

6	Motorlu Pipetler	19	Pastör Pipetler
7	Santrifüj	20	Ağız Pipetleri
8	(-80°C) Dondurucu	21	Distil&Steril Su
9	(-20°C) Dondurucu		
10	4°C Buzdolabı		
11	37°C subanyosu		
12	Otoklav		
13	Sıvı Nitrojen Tankları		

## 2. SOLÜSYON VE KÜLTÜR ORTAMI HAZIRLANIŞI

### 2.1. 0.1% Jelatin Solüsyonu Hazırlanışı

Kök hücre kültürü sırasında kullanılan hücre kültür kapları %0,1'lik jelatin ile kaplanmaktadır. Jelatinle kaplanmış kaplar daha sonra mitotik aktivitesi durdurulmuş destek hücreleri ekimi için kullanılırlar.

1. %0.1'lik jelatin solüsyonu, %2'lik (20X) stok jelatin solüsyonunun steril distile su ile 0,1%'lik olacak şekilde seyreltilmesi ile elde edilir.
2. Seyreltilmiş solüsyon kültür kabı içerisine **Tablo 2**'de farklı kültür kapları için belirtilen kültür ortamı miktarlarına göre yerleştirilir.
3. Kültür kabı içerisine konulan jelatin solüsyonu en az 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
4. Kültür kabı daha sonra parafilm ile kapatılarak +4°C'de buzdolabında saklanır. 4 hafta içinde kullanılmalı veya atılmalıdır.
5. Solüsyon kullanımdan hemen önce aspire edilmeli, kuyucuklar kurumaya bırakılmamalıdır.

### 2.2. EGTA Solüsyonu Hazırlanması

1. Stok EGTA solüsyonu hazırlamak için öncelikle 50 ml'lik konik vida kapaklı falkon tüp içerisine 951 mg EGTA tartılarak 45.4 ml distile steril su ile karıştırılır.
2. Karışım içerisine 600 ul 10M sodium hidroksit eklenerek karışımın çözülmesi sağlanır.
3. pH 8.0 değerine ayarlandıktan sonra 0,20'lik filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklanır.
4. Çalışma solüsyonu 0,5 ml stok EGTA solüsyonunun 49,5 ml Ca-Mg içermeyen PBS solüsyonu ile seyreltilmesi ile elde edilir.
5. Hazırlanan çalışma solüsyonu oda sıcaklığında saklanır.

### 2.3. bFGF Solüsyonu Hazırlanması

bFGF solüsyonu hazırlanmadan evvel bütün tüpler, pipetler ve filtreler bFGF'nin yapışkan özelliğinin olması sebebiyle ıslatılmalıdır.

1. 10 µg bFGF % 0.2 lik BSA içeren 1ml PBS ile çözülür.

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.

Kök hücre kültür ortamı eğer fare embriyonik kök hücre izolasyonu ve kültürü için kullanılacak ise fareye özgü LIF içeren (1000 IU/ml) ESGRO ajanı eklenir. İnsan embriyonik kök hücreleri eğer destek hücresi üzerinde büyütülüyorlarsa LIF maddesinin varlığına ihtiyaç duymazlar. Fakat kültür ortamlarına rutin olarak ITS (1'e 100 oranında) ve bFGF (4 ng/ml) eklenir

## 2.7. Mitomisin-C Stok Solüsyonu Hazırlanması

hES hücrelerinin kaplara ekiminden evvel destek dokusu olarak kullanılan hücrelerin mitotik aktivitesinin durdurulması gerekir, bu işlem mitomisin-C solüsyonu kullanılarak yapılır. Mitomicin-C 'nin karsijenik ve sitotoksik etkisi sebebiyle kullanılmadan evvel eldiven takılmalıdır.

1. 2 mg mitomisin-C içeren tüp 10ml DMEM solüsyonu ile çözülür. 0.22um'lik filtreden geçirilerek +4°C'de karanlıkta muhafaza edilir.
2. 2 hafta içinde tüketilmeli, aksi taktirde atılmalıdır.

## 2.8. %0.05' lik Tripsin/EDTA Solüsyonunu Hazırlanması

Tripsin destek hücrelerini pasajlama esnasında yapıştığı yerden ve birbirlerinden ayırmak için kullanılır.

1. 1ml %0.25 Tripsin/EDTA yı 4ml PBS içinde çözülür.
2. Solüsyon 4°C'de saklanır ve bir hafta içinde kullanılır aksi takdirde atılır.

## 2.9. Vitrifikasyon ve Çözme Solüsyonlarının Hazırlanması

### ***ES-HEPES solüsyonunun hazırlanması***

Bu solüsyon hem vitrifikasyon hem de çözme işleminde kullanılmaktadır, +4°C de saklanmalıdır.

Solusyonlar	Hacim
K-DMEM	15.6ml
FBS	4ml
1M HEPES	0.4ml
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20ml</b>

### ***1M Sukrose solüsyonu***

1. 3.42 gr sükröz 6 ml DMEM-HEPES solüsyonu içinde çözülür.
2. Daha sonra solüsyon sükrözün çözülmesi için 37°C kadar ısıtılır.
3. Solüsyon 8 ml' ye DMEM-HEPES ile tamamlanır ve üstüne 12 ml FBS (Hyclone) eklenir.
4. Solüsyon daha sonra kullanılmak üzere alikotlanıp -20°C'de saklanabilir, sürekli kullanımlarda ise +4°C'de 50 ml'lik falkonlarda tutulabilir.



### **0.2 M Süzkroz solüsyon**

Bu solüsyon embriyonik kök hücre çözme solüsyonlarından biridir. +4°C de saklanmaktadır.

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Hacim</b>
ES-HEPES	4ml
1 M Süzkroz Solüsyonu	1ml
<b>Toplam Hacim</b>	<b>5ml</b>

### **0.1 M Süzkroz solüsyonu**

Solüsyon embriyonik kök hücre çözme esnasında kullanılan solüsyonlardan biridir. +4°C de saklanmaktadır. Bir hafta içinde tüketilmelidir.

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Hacim</b>
ES-HEPES	4.5ml
1M Süzkroze Solüsyonu	0.5ml
<b>Toplam Hacim</b>	<b>5ml</b>

### **%10 Vitrifikasyon solüsyonu**

+4°C de saklanmaktadır. Bir hafta içinde tüketilmelidir.

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Hacim</b>
ES-HEPES	2ml
Etile Glikol	0.25ml
DMSO	0.25ml
<b>Total Hacim</b>	<b>2.5ml</b>

### **%20 Vitrifikasyon solüsyonu**

<b>Solüsyonlar</b>	<b>Hacim</b>
1 M Süzkroz Solüsyonu	0.75ml
ES-HEPES	0.5ml
Etilene Glikol	0.75ml
DMSO	0.5ml
<b>Total Hacim</b>	<b>2.5ml</b>

### **Freezing medium hazırlanması**

Freezing medium, 15 ml'lik konik vida kapaklı falkon tüp içerisine, solüsyon hacmi 10 ml olacak şekilde 5 ml FBS, 4 ml mEF kültür ortamı ve 1 ml DMSO eklenerek hazırlanır. İşlem sırasında DMSO en son ve damlalar halinde eklenmeli, eklenmeden önce tüp soğutulmalıdır.

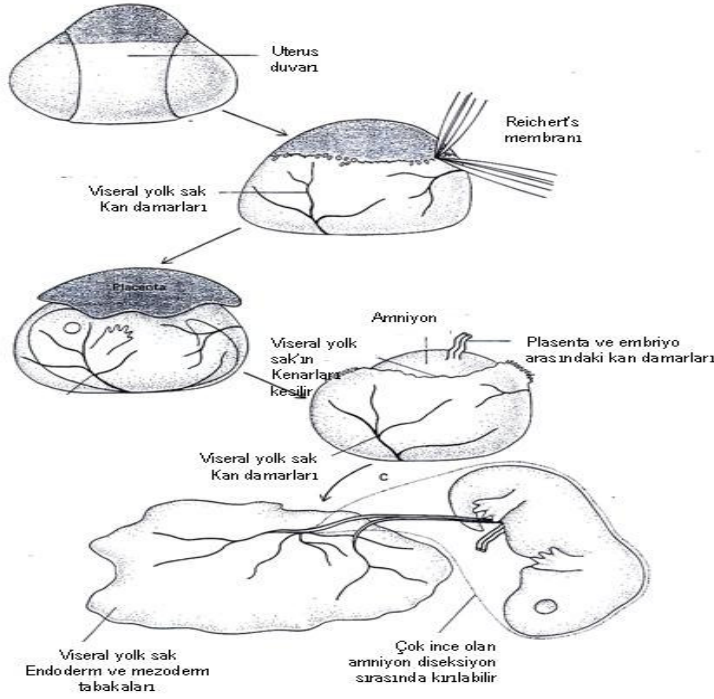
### 3. PROTOKOLLER

#### 3.1. Destek Hücre Amaçlı Fare Embriyonik Fibroblast Hücrelerinin (mEF) İzolasyonu

İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC) destek sistemleri ve/veya ajanların yokluğunda farklı hücre ve dokulardan oluşan yapılara dönüşürler. Genellikle destek hücresi olarak fare embriyonik fibroblast (mEF) hücreleri kullanılmaktadır.

1. Fare fetusları 13-14 günlük gebe farelerden **Resim 1**'de gösterilen şemaya uygun olarak dissekiye edilir.
2. Dissekiye edilen fareye ait tüm fetuslar 10 ml'lik DPBS içeriren 100-mm doku kültür kapları içerisine toplanırlar.
3. Forseps yardımı ile iç organların olduğu abdominal kavite ve baş kısmı diğer vücut kısmından uzaklaştırılır ve yeni DPBS içeren başka bir kültür kabına aktarılır.
4. Benzer şekilde DPBS içeren bir diğer kültür kabına aktarılarak yıkanılırlar.
5. Yıkanan embriyolar daha sonra 3-5 ml tripsin içeren 100-mm doku kültür kabına aktarılarak 16G uçlu şırıngadan geçirilerek küçük parçalara ayrılırlar. Bu işlem 2-4 kez tekrar edilir. Çok sayıda tekrar hücre eldesi oranını düşürebileceğinden genellikle parçalanmış doku 5 veya 10ml'lik pipet içerisine çekilebilecek kıvama geldiğinde işlem durdurulur.
6. Daha sonra parçalanmış dokuların üzerine toplam hacim 10 ml olacak şekilde tripsin solüsyonu eklenir.
7. İçerik nazikçe karıştırılarak 37°C de yaklaşık 10 dakika inkübe edilir.
8. İnkübasyon sonrası solüsyon hafifçe karıştırılarak tekrar 10 dakika inkübasyona bırakılır.
9. İnkübasyon sonrası içerik 50-ml konik tüp içerisine alınarak üzerine eşit oranda penisilin/streptomisin içeren mEF kültür ortamı (**bölüm2.6.**) eklenir. Böylece tripsin de inaktive edilmiş olur.
10. Büyük doku parçalarının sedimentasyon yardımıyla tüpün dip kısmına çökmesi için 3-5 dakika oda sıcaklığında dikey olarak bekletilir.
11. Çöken büyük doku parçalarının aspire edilmemesine özen göstererek üst kısımdaki solüsyon yeni bir tüp içerisine aktarılır.
12. 1000 g 'de 5 dakika santrifüj edilir.
13. Üst faz uzaklaştırılarak çökelti halindeki hücreler mEF kültür ortamı içerisinde karıştırılırlar.
14. Daha sonra solüsyon kültür kaplarına bölünerek tüm yüzeyi kaplayana dek (2-5 gün arası) %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de inkübe edilirler. Her iki günde bir kültür ortamı değiştirilmelidir.
15. Genellikle, mEF hücreleri hES hücrelerini destekleme özelliğini kaybettiği için pasaj 7' ye kadar hESC destek dokusu olarak kullanılmaktadır.

**Resim 1:** Embriyonik fibroblast izolasyonu amaçlı fare fetusları diseksiyonu



#### **a) Fare embriyonik fibroblast hücrelerinin dondurulması ve çözülmesi**

##### **• Freezing işlemi**

1. Dondurma işlemi öncesi tüm taban yüzeyini kaplamış (%80-90confluent) hücreler içeren 75cm<sup>2</sup> flask içindeki kültür ortamı aspire edilir.
2. Daha sonra 2 kez kalsiyum magnezyum (Ca-Mg) içermeyen 3-4ml PBS solüsyonu ile yıkanır.
3. Son yıkama işleminden sonra kap içerisine 2 ml EGTA (**bölüm 2.2.**) solüsyonu konarak 2 dakika inkübasyonu sağlanır.
4. Daha sonra EGTA solüsyonu aspire edilerek kap içerisine 1 ml tripsin/EDTA solüsyonu eklenir. Solüsyonun iyice yüzeye yayılması sağlanarak yaklaşık 3 dakika 37°C'de inkübatörde bekletilir.
5. İnkübasyon sonrası kültür kabı içerisindeki hücreler kabın kenarlarına hızlıca vurularak ve bir kaç kez pipetlemek suretiyle süspansiyon haline getirilir.
6. Daha sonra kabın içerisine 5 ml mEF kültür ortamı koyulur ve tüp 800 rpm'de 8 dakika süre ile santrifüj edilir.
7. Santrifüj sonrası üstte kalan solüsyon uzaklaştırılır ve hücrelerin bulunduğu çökelti resüspanse edilir.
8. Tüp içerisine 3 ml freezing medium eklenir (**bölüm2.9.**) ve tüp nazikçe karıştırılır.

9. Daha önceden hazırlanarak işaretlenmiş olan 3 kriotüp içerisinde her tübe 1 ml gelecek şekilde bölünür. Tüpler -80° C'de bir gece bekletildikten sonra daha önceden belirlenmiş sıvı nitrojen tankındaki yerlerine transfer edilirler.

- **Çözme işlemi**

mEF hücrelerini çözme işleminde hızlı çözme tekniği kullanılmaktadır.

1. Sıvı nitrojen içerisinde çıkartılan kriotüp doğrudan 37 °C'deki su banyosu içerisine alınır.
2. İçerik çözüldükten sonra 10 ml mEF kültür ortamı içeren ve daha önceden pasaj sayısı ve çözme günü bilgileri not edilmiş 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabına alınır ve inkübatördeki yerine kaldırılır.

### 3.2. Destek Hücreleri Olarak Endometrial Hücrelerin İzolasyonu

#### a) Stromal hücre izolasyonu

1. ART siklusuna girecek olan hastalardan tedavi başlamadan evvel lüteal fazdaki endometrial doku biyopsi ile alınır.
2. Biyopsi materyali 5 ml HBSS solüsyonu içeren falkona transfer edilir.
3. Daha sonra endometrial dokusu küçük parçalara bölünür ve kırmızı kan hücrelerini ve mukusu dokusunu ayırmak için 5000µg/100 ml penisilin-streptomisin içeren HBSS solüsyonu ile iyice yıkanır.
4. Doku parçacıkları HBSS ile yıkandıktan sonra %0.2 tip II kollejenaz (Sigma) içeren HBSS ile 37°C de 5 dakika boyunca sallanmalı su banyosunda inkübasyona bırakılır.
5. Hücre topları steril pipetten geçirilerek homojenize edilir.
6. Homojenize doku 5 dakika boyunca sedimentasyon yardımıyla tüpün dip kısmına çökmesi için 3-5 dakika oda sıcaklığında dikey olarak bekletilir.
7. Supernatant 15ml' lik falkonlara alınarak 400g de 5 dakika santrifüj edilir.
8. Sedimentasyondan sonra pellet 5000µg/100ml penisilin-streptomisin ve %10 maternal serum içeren RPMI-1640 solüsyonu içinde süspansiyon edilir.
9. Yukarıda ki protokol 4 kez tekrarlanarak stromal hücreler elde edilir.

#### b) Glandular hücre izolasyonu

Glandular hücrelerinin izolasyonu stromal hücrenin izolasyonuna benzemektedir. Stromal hücre izolasyonunun 7. basamağına kadar uygulanan protokoller glandular hücre izolasyonu içinde geçerlidir. 6. basamaktan sonra uygulanması gereken protokol aşağıdaki gibidir;

1. HPSS solüsyonu içinde ki supernatant( stromal hücre içermektedir) atılır ve glandular hücreleri içeren pellet %10 maternal serum, 5000ug/100 ml penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 solüsyonu içinde süspansiyon edilir.

Her iki hücre tipi kültür flasklarına konur ve 37°C, 5% CO<sub>2</sub> de inkübe edilir. Hücrelerin kültür ortamları (destek doku kültür ortamı) her 2-3 günde bir değiştirilir.

### 3.3. Destek Hücreleri Olarak İnsan Sünnet Derisinden Fibroblast Hücreleri İzolasyonu

İnsan sünnet derisi fibroblast hücreleri 6-7 yaşlarındaki erkek çocuklarının sünnet derisinden elde edilir.

1. Sünnet derisi laboratuvara %0.9 saline solüsyonu içinde getirilir ve getirilmez endometrial hücrelerin izolasyonunda kullanılan protokola benzer protokol uygulanır.
2. Doku küçük parçalara bölündükten sonra Tip IV kolejenaz ile 15dk boyunca sallanmalı inkübatörde inkübasyona bırakılır.
3. Kolejenazla parçalanmış dokunun tüpün dip kısmına çökmesi için 3-5 dakika oda sıcaklığında dikey olarak bekletilir.
4. Supernatant başka bir tüpe alınır ve pellet tekrar kolejenaz kullanılarak süspansiyon edilir. Bu işlemler birkaç kez tekrarlanır ve daha sonra tripsin eklenir.
5. Tripsinin eklenmesiyle birlikte doku tamamen parçalanarak hücrelere ayrılır.  
Bu süspansiyon 25cm<sup>2</sup> lik flasklara ekilir. Flasklar 37°C, %5 CO<sub>2</sub> deki inkübatöre konur ve hücrelerin flasklara tutunup tutunmadığı bir sonraki gün kontrol edilir.
6. İnsan sünnet derisi fibroblast hücreleri destek dokusu olarak pasaj 2 den sonra kullanılmalıdır. Hücreleri dondurmak için pasaj 2 beklenmelidir.

### 3.4. Destek Dokusuyla Kaplanmış Platlerin Hazırlanışı

#### a) *Fibroblast hücrelerinin inaktivasyonu*

1. 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kabının %80-90 nını kaplamış olan destek hücrelerinin (mEF, endometrial, amniotik, insan sünnet derisi fibroblast hücreleri) kültür ortamı aspire edilir ve hücreler bir kaç kez (2-3) 3-4ml Ca-Mg-içermeyen PBS solüsyonu ile yıkanır.
2. Hücrelerin üzerine 0.5ml mitomisin-C (**bölüm2.4.**) içeren 10ml destek hücre solüsyonu (1:20 dilüsyon) eklenir ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37°C'de en az 2-3 saat inkübe edilir.
3. İnkübasyon sonrası, kültür ortamı aspire edilir, hücreler en az üç defa 3-4ml Ca-Mg-içermeyen PBS solüsyonu ile yıkanır.
4. Hücreler tripsin kullanılarak kültür kabından ayrılır ve kültür ortamı içerisine alınırlar. Hücre sayımı sonrası daha önceden jelatin solüsyonuyla (**bölüm2.1.**) kaplanmış kültür kaplarına **Tablo 2.1**'de belirtilen oranlar dikkate alınarak ekim işlemi yapılır.

**Tablo 2.1.** Farklı kültür kaplarında ki mEF ve Jelatin konsantrasyonları

Kültür Kabı	Yüzey alanı (mm <sup>2</sup> )	Tripsin/EDTA miktarı (ml)	MEF kons. (hücre)	KültürOrtamı /jelatin miktarı
75 cm <sup>2</sup> kültür flasksı	7500	3-4	5,63x10 <sup>6</sup>	15
25 cm <sup>2</sup> kültür flasksı	2500	1	1,88x10 <sup>6</sup>	6
100 mm Petri kabı	7854	3-4	13,25x10 <sup>6</sup>	20
60 mm Petri kabı	2827	2	7,20x10 <sup>6</sup>	10
35 mm petril kabı	962	1	2,1x10 <sup>6</sup>	2-3
6-kuyucuklu kültür kabı	962	0,5	7,2x10 <sup>5</sup>	2-3
4-kuyucuklu kültür kabı	190	0,2-0,5	1,43x10 <sup>5</sup>	0,5-1
24-kuyucuklu kültür kabı	200	0,2-0,5	1,5x10 <sup>5</sup>	0,5-1
96-kuyucuklu kültür kabı	30	0,1	2,2x10 <sup>4</sup>	0,1-0,2

**b) Destek hücresi sayımı**

1. Hematositometrenin dört köşesindeki hücreler sayılır.
2. Daha sonra toplam hücre sayısı sayılan köşe sayısına bölünerek averaj hücre sayısı hesaplanır.
3. Mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Hücre/ml} = (\text{Averaj Hücre Sayısı} \times \text{Dilüsyon katsayısı}) \times 10^4$$

4. Toplam hücre sayısı ise;

$$\text{Toplam Hücre} = \text{Hücre / ml} \times \text{Toplam Süspansiyon Hacmi}$$

5. Destek hücre kaplarının hücre sayısı istenilen yoğunlukta ayarlanabilir. Örnek olarak;

$$\# \text{ Hücre} = (0,75 \times 10^5 \text{ hücre / ml}) \times 2,5 \text{ ml /well} \times (6 \text{ wells / plate}) \times \# \text{ plates}$$

**3.5. İnsan Embriyonik Kök Hücre İzolasyonu**

Embriyonik kök hücreler blastosist aşamasındaki embriyonun ileri gelişim dönemlerinde fetus'u oluşturacak iç hücre kütesinin laboratuvar şartlarında izolasyonu ve in vitro kültürü ile elde edilirler.

Günümüzde bu amaçla kullanılan en yaygın teknik, özellikle fare embriyonik kök hücre izolasyonu işlemlerinde kullanılan mekanik ayrıştırma yöntemidir. Bu yöntemde öncelikle işlem için kullanılacak blastosistler özel asit solüsyonu (acid tyrode) kullanılarak veya enzimatik yolla (pronase) embriyoyu çevreleyen zona pelusida katmanından ayrılırlar. İşlem sonrası daha önceden hazırlanmış destek hücreleri içeren kültüre veya destek hücre olmaksızın hazırlanmış LIF içeren kültür ortamı içerisine alınırlar. Yaklaşık 4 gün süren kültürleri sırasında blastosist yapısını oluşturan trofektoderm hücreleri destek hücresi üzerine veya kültür kabının tabanına yayılarak iki boyutlu bir yapı oluştururken iç hücre kütesini oluşturan hücreler küresel olarak genişler ve trofektoderm tabakası üzerinde 3 boyutlu bir katman oluşturur. Oluşan bu yapı, kültür sonunda uygun büyüklüğe ulaştığında mekanik olarak

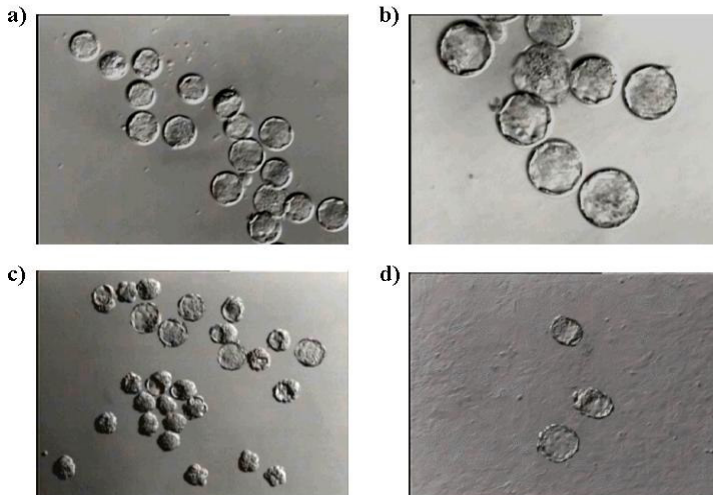
trofektoderm tabakasından ayrılır, tripsin solüsyonu ile küçük hücre kolonilerine ayrılarak taze destek hücresi veya kültür ortamı ile hazırlanmış yeni kültür kaplarına transfer edilirler.

İkinci yöntem immunosurgery adı verilen ve trofektoderm tabakasını oluşturan hücrelerin immünolojik yöntemler kullanılarak iç hücre kütlelerinden ayrılması esasına dayalı bir yöntemdir. Bu metod, insan embriyonik kök hücre izolasyon işlemlerinde mekanik yöntemle göre daha sık kullanılmaktadır.

#### **a) Pronase uygulaması ile blastosist aşamasındaki embriyolardan zona pelusida katmanının uzaklaştırılması**

1. İşlem öncesi 4-kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 1 ml ES kültür ortamı (**bölüm2.3.**) konulur.
2. 1 no'lu kuyucuk içerisine stok solüsyonundan 20 ul pronase konularak kültür kabının kapağı kapatılır (Final kons.: 10IU/ml) ve yaklaşık 30 dakika 37°C 'de inkübe edilir.
3. İnkübasyon sonrası fare uterusundan elde edilen blastosistler öncelikle pronase içeren 1 no'lu kuyucuğa transfer edilerek burada 2-3 dakika bekletilir.
4. İnkübasyon sonrası zona pelusida katmanı dağılmış blastosist aşamasındaki embriyolar dikkatlice pipet içerisine çekilir; enzim içermeyen 2, 3 ve 4. nolu kuyucuklarda yıkanarak destek hücresi içeren kültür kaplarına alınırlar (**Resim 2**).

**Resim 2:** a,b) Uterustan flushing işlemi sonrası elde edilen fare blastosistleri; c) Pronase enzimi uygulaması sonrası zona pelusida katmanı uzaklaştırılmış fare embriyoları; d) Destek hücresi üzerinde kültür edilen zona katmanı uzaklaştırılmış fare blastosistleri.



#### **b) Immunosurgery yöntemi kullanılarak blastosist aşamasındaki embriyodan iç hücre kütlesi izolasyonu**

Eğer kullanılacak embriyolar zona katmanı dışına çıkmamışlarsa (hatching), öncelikle pronase enzimi kullanılarak zona pelusida katmanından ayrılırlar. İşlem sırasında spontan olarak büzüşen

ekspansiyon blastosistler tekrar genişlemelerinin sağlanması için 30 dakika veya 1 saat 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> altında inkübe edilirler.

- *Kuyucuklar ve kullanılan medyumla*

Kuyucuk-1: DMEM+L-glutamine+ Primer antikor (**bölüm 2.4.**)

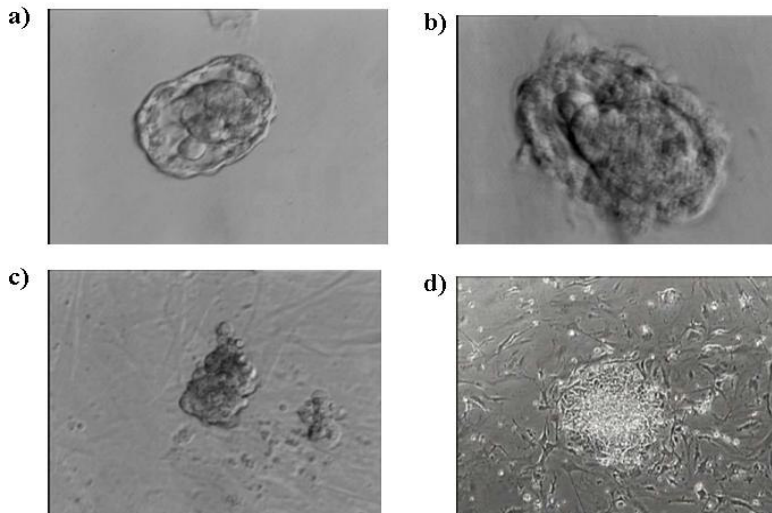
Kuyucuk-2: DMEM+L-glutamine+Guinea Pig Complement (20-25%) (**bölüm2.5**)

Kuyucuk-3: DMEM+20%FBS (yıkama için)

Kuyucuk-4: DMEM+20%FBS (yıkama için)

1. İmmunosurgery uygulanacak blastosist öncelikle primer antikor içeren 1. kuyucuğa transfer edilir ve %5'lik CO<sub>2</sub> ve 37°C'de yaklaşık 30 dakika inkübe edilir (inkübasyon süresi antikor konsantrasyonuna göre ayarlanmalıdır).
2. İnkübasyon sonrası embriyo nazikçe 3.kuyucukta yıkanır ve guinea pig complement içeren 2 nolu kuyucuğa alınır. 5% CO<sub>2</sub> altında ve 37°C'de yaklaşık 20 dakika inkübe edilir.
6. İnkübasyon sırasında trofektoderm yapısı değerlendirilir. Liziz sonrası trofektoderm hücreleri dejenere ve koyu görünümlüdürler. Bu aşamadaki blastosist, çapı azalan pipetler içerisine aspire edilip tekrar geri verilmek suretiyle Trofoblast hücrelerinin ayrılır.
7. Elde edilen intakt iç hücre kütlesi embriyonik kök hücre kültür ortamında yıkanarak önceden hazırlanmış destek hücreleri üzerine alınır. dejenere trofektoderm hücrelerinden ayrılır.
8. İşlemden sonraki günlerde izole edilen iç hücre kütesinin gelişim kontrolü ve kültür ortamı değiştirilmesi günlük olarak yapılır.
9. Yaklaşık 8-10 gün sonra gelişen koloni taze hazırlanmış MEF içeren kültür kabı kullanılarak pasajlanır (**Resim 3**).

**Resim 3:** İmmunosurgery ve sonrası iç hücre kütesi izolasyonu ve kültürü. a) zona katmanının uzaklaştırılması sonrası blastosist aşamasındaki embriyonun primer antikor ile inkübasyonu; b) Guinea pig complement ajanı ile inkübasyon sırasında gözlenen liziz aşamasındaki trofektoderm hücreleri; c) seri pipetleme sonrası trofektoderm hücrelerinden ayrılarak fibroblast destek hücreleri üzerine alınmış iç hücre kütesi; d) iç hücre kütesinin ileri kültürü sonrası elde edilen kök hücre kolonisi.





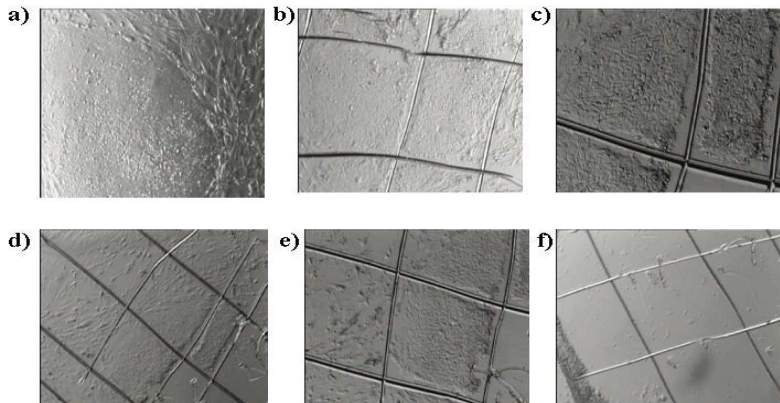
### 3.6. Embriyonik Kök Hücrelerin Uzun Süreli Kültürleri (Pasajlama)

Fare ve insan embriyonik kök hücrelerinin morfolojik yapıları ve destek hücre gereksinimlerindeki farklılıkların yanında, pasajlama işlemlerinde de farklılıklar mevcuttur. Fare embriyonik kök hücrelerinde ileri kültürleri sırasında rutin hücre kültüründe kullanılan tripsin/EDTA (**bölüm2.2.**) yolu ile pasajlama yapılabiliyor iken, insan embriyonik kök hücrelerinin belirli bir hücre sayısının altında, özellikle tek hücre olarak pasajlanması güçtür. Bu nedenle insan embriyonik kök hücrelerinde kollajenaz veya dispase enzimleri yardımcı ajan olarak kullanılırlar. Hücre pasajlama işlemi, gelişen koloninin cam pastör pipeti kullanılarak kültür kabı tabanından ayrılması ve yeni kaba transfer edilmesi şeklinde gerçekleştirilir.

#### • *İnsan Embriyonik kök hücreleri pasajlanması*

1. Pasajlama öncesinde her bir kuyucuğu 1 ml PBS içeren 4-kuyucuklu kültür kabı hazırlanır.
2. Pasajlanacak insan embriyonik kök hücre kolonileri içeren kültür kabı 2 kez D-PBS ile yıkanır.
3. 7Yıkama sonrası önceden hazırlanmış ve inceltilmiş cam pastör pipeti ile koloni, farklılaşma olmayan bölgelerin olduğu kısımdan küçük parçalara ayrılır.
4. İşlem sırasında kültür kabı tabanından ayrılan koloni parçacıkları PBS ile yıkanarak yeni kültür ortamına alınırlar.
5. Tabana yapışık olarak duran parçacıkları ayırmak için öncelikle PBS nazıkçe aspire edilerek yerine daha önceden hazırlanmış ve 37°C'de ısıtılmış olan dispase çalışma solüsyonu konur.
6. 2 dakika süreli inkübasyon sonrasında kültür kabı tabanından ayrılan koloni parçaları ağız pipeti veya mikropipet kullanılarak PBS içeren 4-kuyucuklu kültür kabına aktarılır.
7. Burada yıkanan koloni parçaları, taze hazırlanmış MEF destek hücresi içeren yeni kaplara alınırlar.
8. Her bir kap içerisine 4-5 koloni parçası transfer edilir.
9. Pasaj sonrası, transfer edilen koloni parçacıklarının gelişimi ve farklılaşma durumları not günlük olarak not edilir (**Resim 4**).

**Resim 4:** İnsan embriyonik kök hücre pasajlama aşamaları. a) Pasaj öncesi insan embriyonik kök hücre kolonisi; b) pasaj sırasında özel hazırlanmış cam pastör pipeti ile gerçekleştirilen koloni kesme işlemi; c-e) Kesim sonrası bölünmüş ve kültür kabı yüzeyinden ayrılmaya hazır koloni parçaları f) Pasaj sonrası kültür kabı görünümü.

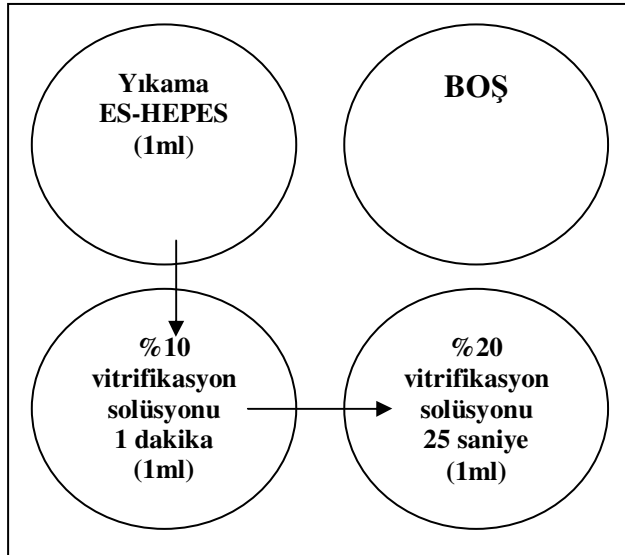


### 3.7. Embriyonik Kök Hücre Dondurma/Çözme İşlemleri

Embriyonik kök hücrelerin dondurulması ve çözme işlemleri yukarıda mEF hücreleri için verilen protokol kullanılarak gerçekleştirilir. Dikkat edilmesi gereken birinci konu, kullanılacak FBS'nin kök hücre test edilmiş olmasıdır. İkinci konu ise, insan embriyonik kök hücrelerinin tek hücre aşamasına indirildiğinde ileri gelişim potansiyellerinin çok düşük olduğudur. Bu nedenle her ne kadar fare embriyonik kök hücrelerinde tripsin kullanılsa da insan embriyonik kök hücrelerinde bu yöntemle kıyasla vitrifikasyon yöntemi tercih edilmektedir.

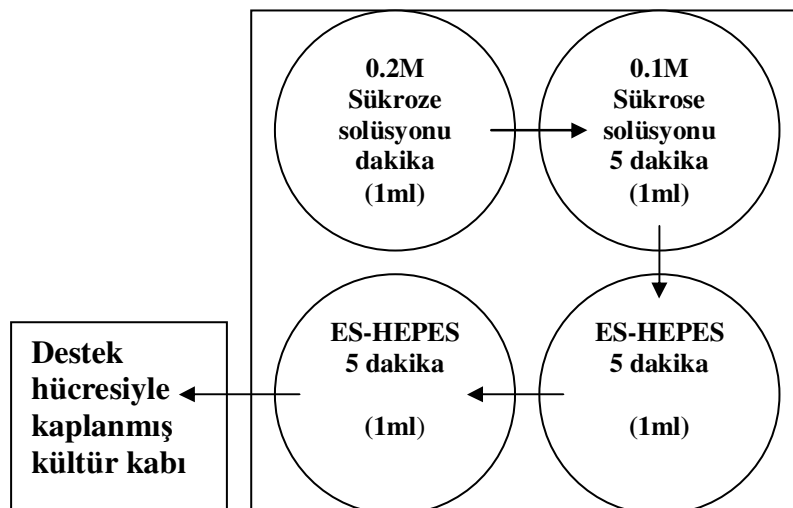
- **Embriyonik kök hücrelerinin vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması**

Embriyonik kök hücreler dondurulmadan evvel pasajlanarak küçük kolonilere bölünürler ve 1. kuyucuktaki yıkama solüsyonu içine konurlar. Mikropipetle yıkama solüsyonundan çektiğimiz 5 µl kök hücre kolonileri aşağıda belirttiğimiz kuyucuklarda sırasıyla belirtilen süreyle yıkanır ve hemistrawlara konarak hemen sıvı nitrojenle vitrifiye edilir ve nitrojen tanklarına konur.



- **Embriyonik kök hücre çözme işlemleri (thawing)**

Embriyonik kök hücrelerin çözme işlemi yapılırken aşağıdaki şekilde belirtilen protokol uygulanır.



#### 4. EMBRİYONİK KÖK HÜCRE TANIMLAMASI YAPILIRKEN UGULANAN YÖNTEMLER

Embriyonik kök hücrelerinin uzun dönemli kültürleri esnasında hücreler embriyonik kök hücre özelliğini veren temel nitelikleri bakımından belirli testlerle/uygulamalarla kontrol edilirler. Bu uygulamalar hücrelerin tekrardan karakter tanımlaması açısından önemlidir.

Şimdiye kadar embriyonik kök hücre karakter tanımlanmasında hangi kriterlerin veya hücrelerin hangi temel niteliklerinin baz alınması gerektiği noktasında bilim adamları arasında tam bir uzlaşma yoktur. Buna rağmen aşağıda bahsedeceğim ve laboratuvarımızda rutin olarak yapılmakta olan testler bilim adamlarınca geniş kabul görmekte ve embriyonik kök hücre tayininde kullanılmaktadır.

3. Embriyonik kök hücrelerin uzun süreli kültürlenmesi ile hücrelerin undiferansiye şekilde yenilenme potansiyelleri ölçülmektedir. Yukarı da bahsettiğimiz protokollerin genel amacı hücreleri bu özellikleri bakımından test etmektir.
4. Hücrelerin undiferansiye olup olmadıkları undiferansiye embriyonik kök hücrelere özel yüzey markırlarına (SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81) bakılarak test edilir.
5. Hücrelerin undiferansiye olup olmadıklarını test etmenin diğer bir yöntemi ise yine embriyonik kök hücrelerine spesifik Oct-4 transkripsiyon faktörü geninin ekspresyon seviyesine bakmaktır.
6. Düzenli olarak karyotip analizi yaparak hücrelerdeki kromozomal anomaliler tespit edilir. Hücrelerin kök hücre özelliğinin devamı kromozomal anomalilerin/mutasyonların bulunmamasına bağlıdır.
7. Hücreler düzenli olarak dondurulur, çözülür ve tekrar kültürlenir. Böylelikle hücrelerin subkültürleme özelliği test edilir.
8. İnsan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent özelliği ise hücrelerden embriyoid body yapılarak farklı özellikteki hücrelere diferansiye olup olmadığı test edilir.

##### 4.1. Karyotip Analizi

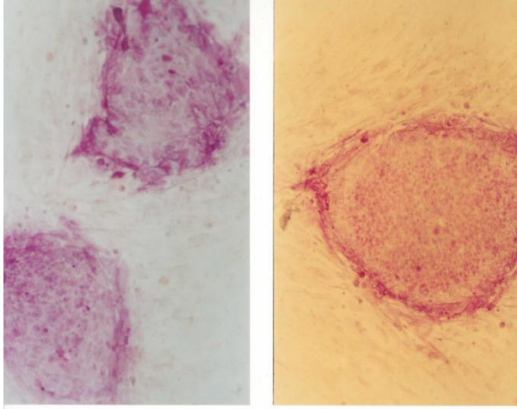
1. Embriyonik kök hücre kolonileri buldukları kültür ortamlarına her bir kültür kabına 2 damla 0.1 ug/ml Colcemid eklenerek 3 saat 37C 'de %6'lık CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edilir.
2. İnkübasyon sonrası koloniler mekanik, el darbeleriyle, ve enzimatik (Collagenase IV) yöntem yardımıyla destek hücrelerinden ayrılarak 15 ml konik falkon tüp içerisine alınır.
3. Kök hücre kültür ortamı ile 1300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanır ve oluşan çökelti 9ml hipotonik medium (0,075M KCl) ile resuspanse edilir.
4. 13-17 ( ortamın sıcaklık, nem koşullarına bağlı) dakika 37 C'de inkübe edilen hücreler 9ml 3:1 oranında metanol/asetik asit ile fikse edilir ve lamellere serilerek G-banding yöntemi uygulanır.

## 4.2. İmmunohistokimya

Alkalın fosfataz ekspresyon analizi Stem Cell Characterization Kit (Chemicon) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol kullanılarak pasajın 5 veya 7.nci gününde gerçekleştirilir.

1. Koloniler %90 metanol / %10 formalin solüsyonu kullanılarak 2 dakika süre ile fikse edilir.
2. Fiksasyon sonrası kültür kabı TBST solüsyonu (20 mM Tris-HCl, Ph:7.4, 0.15M NaCl, %0.05 Tween-20) ile yıkanır.
3. Kurumaya bırakılmadan üzerine Naphtol/Fast Red Violet solüsyonu eklenerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası hücreler AP ekspresyonu (kırmızı) yönünden ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirilir (resim)

**Resim 6 :** Farklılaşmamış kök hücreleri tanımlamada kullanılan alkalın fosfataz boyaması sonrası elde edilen görüntüler.



## 4.3. Farklılaşmış Kök Hücrelerin Floresans Boyama Tekniğiyle Analizi

### a) Kök Hücrelerden Embrioid Body Oluşturulması

Embriyonik kök hücrelerden embrioid body oluşturmaktaki amaç hücreleri 3 germ yaprağına ait diğer dokulara farklılaştırmak ve farklılaşan hücreleri değişik yöntemlerle karakterize etmektir.

#### • Fare kök hücrelerinden embrioid body oluşturulması (hanging drop)

1. Embrioid body oluşturacağımız fare kök hücrelerinin 2 gün evvelden kültür ortamlarına LIF eklemeyerek farklılaşmaya başlamaları sağlanır.
2. 2. günün sonunda fare embriyonik kök hücrelerini büyüttüğümüz flaskların kültür ortamı atılır, 2-3 kez PBS (Mg-Ca free) ile yıkandıktan sonra tripsin ile hücreler pasajlanır.
3. 2-3 dk 37°C de inkübatörde beklettiğimiz tripsinli hücrelerin üstüne 5ml mEF kültür ortamı konarak tripsin inaktive edilir.
4. Tüplere aldığımız hücreler 5dk boyunca 1000g de santrifüj edilir.
5. Supernatant atıldıktan sonra pellet 10ml ESC kültür ortamında süspansiyon edilir. Hücreler hematositometre ile sayılarak  $4 \times 10^4$ /ml olacak şekilde konsantrasyonu ayarlanır.

6. 100mm'lik kültür kaplarının içine 5ml PBS konur, kapağına iç tarafına ise  $4 \times 10^4$ /ml hücre konsantrasyonuna sahip ESC kültür ortamından 20 µl lik damlacıklar konur. Yapılan araştırmalar hücre sayısındaki değişikliğin fare kök hücrelerinin farklılaştığı hücre tipini de değiştirdiğini göstermiştir.
7. Damlacıklarla kaplanmış olan kapak hızlı bir şekilde ters çevrilerek kapatılır. 2 günde bir damlacıklar değiştirilerek 10 gün hücrelerin kistik ( embrioid body) yapıya sahip olması için yeterli bir süredir.
8. Kistik yapıya sahip olan fare embriyonik hücreleri daha sonra kültür kaplarına konur. ESC kültür ortamları 2-3 günde bir değiştirilir ve hücrelerin farklılaşması gün ve gün invert mikroskop kullanılarak takip edilir

- **İnsan kök hücrelerinden embrioid body oluşturulması**

İnsan kök hücreleri fareden farklı olarak koloni halinde embrioid body

oluşturabilmektedir. Bu nedenden kullanılan teknik bazı farklılıkla içermektedir.

1. Pasajlanabilecek büyüklüğe gelmiş olan insan embriyonik kök hücreleri inceltilmiş pastör pipetiyle pasajlanarak 6ml ECS kültür ortamı içerek bakteri kültür kaplarına konur ve kolonilerin kistik bir yapıya dönüşmesi için yaklaşık 10 gün boyunca  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  inkübasyona bırakılır. Hücrelerin kültür ortamı 3 günde bir değiştirilir ve zemine yapışıp yapışmadıkları kontrol edilir. Yapıştıkları gözlemlendiğinde mikropipet yardımıyla kaldırılıp yüzmeleri sağlanır.
2. 10 gün sonunda kistik yapıya sahip olan kök hücre kolonileri kültür kaplarına konur ve yapışmaları sağlanır. Zemine yapışan embrioid bodyler günden güne farklılaşarak değişik hücre tiplerine dönüşürler.
3. Kültür kaplarının solüsyonu 3 günde bir değiştirilmelidir.

**b) Floresan Boyama**

1. Fiksasyon için hücrelerin yüzeyini örtecek miktarda %4 paraformaldehide / PBS solüsyonu konur. 15-20 dk beklenir.
2. 2 kez 5dk boyunca PBS ile yıkanır.
3. %0.1 Triton X-100/PBS konur ve hücrelerin geçirgenliğini sağlamak için 10dk oda sıcaklığında beklenir.
4. 2 kez 5 dk boyunca PBS ile yıkanır.
5. Blocking solüsyonu (Labvision) ekleyerek oda sıcaklığında 30 dk beklenir.
6. Primer antikolar (SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81) 1:50 oranında blocking solüsyonu ile dilüe edilir ve hücrelerle 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
7. İnkübasyon sonrası primer antikor solüsyonu aspire edilir ve hücreler 3 defa, her defasında 5 dk olmak üzere, 1X PBS ile yıkanır.

8. 1:100 oranında blocking solüsyonu ile dilüe edilmiş olan sekonder antikorla hücreler oda sıcaklığında 30-60 dk boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılır.
9. Süre sonunda sekonder antikor aspire edilir ve hücreler 3 defa, her defasında 5 dk olmak üzere, karanlıkta 1X PBS ile yıkanır.
10. Karanlıkta 2-3 saat bırakılmış hücreler floresan mikroskop kullanılarak incelenir.