



## Klinik Sitogenetik Laboratuvarında Kan Kültüründen Yeterli Sayıda ve Yüksek Çözünürlükte Metafaz Alanı Elde Etmek için Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Serdar YÜKSEL<sup>1</sup> Özgür EROĞLU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Milli Eğitim Bakanlığı, KMTAL, Kiraz/İZMİR

<sup>2</sup> Van Bölge Eğitim Araştırma Hastanesi ,VAN

\*Sorumlu Yazar:

E-posta: serdarykl@gmail.com

Geliş Tarihi : 01 Temmuz 2018

Kabul Tarihi: 31 Ekim 2018

### Özet

Klinik sitogenetik, insan kemik iliği, fibroblast hücreleri ve lenfosit hücrelerini dış ortamda üretilip metafaz aşamasında durdurmak sureti ile mikroskop preparatları hazırlanması, bu preparatların boyanması, kromozomal bantların elde edilmesi ve insan kromozomlarının sayısal ve yapısal olarak değerlendirilmesi çalışmaları olarak özetlenebilir. Klinik sitogenetik çalışmaları görüşte basit bir hücre kültürü çalışmasını takiben yapılan preparat boyanması gibi basitçe özetlenebilir, aslında zahmetli, sabır isteyen, uzman ve tecrübeli laboratuvar personeline ihtiyaç duyulan, hassas, kimi zaman iklim ve bölgesel koşullar tarafından bile etkilenen süreçleri içerir. Dolayısı ile sitogenetikte yeterli ve kaliteli metafaz alanı elde etmek zordur. Bu nedenle bu çalışmada sitogenetikte yeterli sayı, kalite ve yüksek bant çözünürlüğünde metafaz alanı elde etmek için yapılması gerekenlerden bahsettik. Periferik kan ve kordon kanı hücre kültürü ile hücre üretim aşamaları, boyama prosedürleri karşılaştırılarak, en etkili yöntemler ve bu aşamalarda dikkat edilmesi gereken noktalar belirtildi. Klinik sitogenetikte hangi örnek çalışılıyorsa çalışılın en kritik aşama hücre kültürü evresidir. Numunenin alınması, numunenin durumu, ekim aşaması, ekim sonrası inkübatörde üreme ve enfeksiyon takibi, kan kültüründe inkübatörde bulunan örneğin çökmesinin önlenmesi, besiyeri seçimi, besiyeri takibi, fiksasyon aşamasında çok yavaş metanol-asetik asit eklenmesi özellikle önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Klinik sitogenetik, Karyotip, Hücre Kültürü, Kromozom Boyama

## Points to Be Considered to Obtain Quality Metaphase Area in Clinical Cytogenetic Laboratory

### Abstract

Clinical cytogenetics, production of human bone marrow cells, fibroblast cells and lymphocyte cells in vitro, preparation of microscope preparations and stopping in the metaphase stage these cells, staining of these preparations, obtaining of chromosomal bands and quantitative and structural evaluation of human chromosomes can be summarized. Clinical cytogenetic studies involve processes that are sensitive, sometimes even influenced by climate and regional conditions, which are simply summarized by a simple cell culture study following a simple cell culture study, but in fact require laborious, patient, expert and experienced laboratory personnel. Therefore, it is difficult to obtain sufficient and high quality metaphase area in cytogenetics. For this reason, we mentioned in this study what to do in order to obtain metaphase field in cytogenetics in sufficient number, quality and high band resolution. The most effective methods and the points to be noted in these steps were determined by comparing the staining procedures of cord blood, peripheral blood cell culture with cell culture stages. If the sample is studied in clinical cytogenetics, the most critical stage of the study is the cell culture stage. Addition of methanol-acetic acid is particularly important for the sampling of the sample, the state of the sample, the stage of sowing, the growth and infection in the post-sowing incubator, the prevention of precipitation in the incubator in the blood culture.

**Keywords:** Clinical cytogenetics, Karyotype, Cell culture, Chromosome staining

### GİRİŞ

Genetik araştırmalar genom projesinin gerçekleştirilmesi, insan genetik yapısının tamamıyla ortaya konulmasıyla günümüzde büyük ilerlemelere tanık olmuştur. Mevcut araştırmalar ışığında kanser ve diğer birçok hastalığın temelinde hücre bölünmesini ve replikasyon mekanizmalarının regülasyonu kontrol eden genlerde ortaya çıkan mutasyonların neden olduğu ortaya konulmuştur [1]. Bu gelişmelere rağmen genlerin ortaklaşa etkileşimleri, aktivite alanları ve senkronizasyonları tamamıyla çözülmüş değildir. Genom projesinin sağladığı büyük miktardaki verinin artık günümüzde yorumlanıp, metabolizma ve genetik hastalıkların genetik mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için biyoinformatik bilimi ortaya çıkarmıştır [2].

Bütün bu gelişmelerin öncesinde çoğu hastalığın ilgili olduğu gen ve kromozom bölgeleri neredeyse tamamen aydınlatılmıştır. Bu hastalıklarla ilgili moleküler

sitogenetik araştırmalar rutin sitogenetik laboratuvarlarında gerçekleştirilmektedir [3]. Konvansiyonel klinik sitogenetik araştırmaları rutin olarak yaklaşık 50 yılı aşkın bir süredir devam etmektedir. Bu çalışmaların başlangıcında kromozomal anomaliler otozomal (genel vücut yapısı ile ilgili) ve gonozomal (cinsiyet ile ilgili) olarak değerlendirilmekteydi. Fakat günümüzde bu sınıflandırmadan vazgeçilmiştir [4]. Günümüzde kromozomal anomaliler yapısal ve sayısal olarak iki farklı kategoride değerlendirilmektedir. Sayısal anomalilere örnek verilecek olursa toplumda diğer genetik anomalilere nazaran en yaygın görüleni Down sendromu (trizomi 21) vakasıdır. Trizomi 18, trizomi 15, trizomi X, tetrazomi X diğerlerine örnek verilebilir. Cinsiyet kromozomlarında ortaya çıkan monozomi, trizomi ve tetrazomiler genel olarak yaşla bağdaşmakla birlikte üreme ve zeka sorunlarına neden olmaktadır. Otozomal kromozomların trizomileri

ciddi metabolik ve yapısal hasarlara neden olabilmektedir. Yapısal anomalilerin başında translokasyon gelmektedir. Translokasyonlar neticesinde parça kaybı olmamışsa dengeli translokasyon, eğer parça eksilmişe dengesiz translokasyonlardan bahsedilir. Dengesiz translokasyonlar delesyonlara neden olacağı için prenatal sitogenetikte oldukça önemlidir [5]. Yapısal anomalilerin diğerlerine inversiyonlar, delesyonlar ve duplikasyonlar örnek verilebilir. Her ne kadar yapısal yeniden düzenlenmeler dengeli olarak değerlendirilse de kopma ve yapışma bölgelerinde olabilecek muhtemel gen hasar ve kayıpları ihtimali her zaman için mevcuttur. Marker kromozomlar ise sentromer bölgesinin varlığı veya yokluğuna bağlı olarak vucut hücrelerine eşit olarak dağılmamakta etkileri ise heterokromatin ve ökrromatin bölge varlığına bağlı olarak değişmektedir [6].

Günümüzde yukarıda bahsedilen triploidi, translokasyon, inversiyon, duplikasyon, delesyon ve marker kromozomlar gibi yeniden düzenlenmeler moleküler yöntemler ile de tespit edilmektedir. Fakat bu moleküler yöntemler sadece belli kromozom ve kromozom bölgelerine özel olduğundan dolayı hastanın bütün kromozomlarının normalliği veya anormallığı konusunda karar verememizi sağlamaz. Ayrıca sitogenetik ve moleküler genetik testlerinin birbirlerini destekler biçimde uyumlu olmaları hastalık hakkındaki tanıyı güçlendirmektedir [7].

Sitogenetik testler hasta karyotipinin belirlenmesi konusunda alternatifsiz olmakla beraber sonuçların nispeten uzun sürede çıkması, deneyimli laboratuvar personeline ihtiyaç duyulması, mevsimsel döngülerden etkilenmesi ve çok aşamalı olmaları güçlükler yaratmaktadır [8]. Bu nedenlerden dolayı mevsimsel ve bölgesel farklılıklara dayalı laboratuvar optimizasyonlarının iyi yapılması ve sınır değerlerinin belirlenmesi, FISH çalışmalarında laboratuvar hata oranını veren cut – off iyi hesaplanması sonuçların güvenliği ve kalitesi açısından özellikle önemlidir [9].

Bu yazıda doğum öncesi ve erişkin hastaların genetik testlerinde kullanılan konvansiyonel sitogenetik testlerinden kan kültüründen bahsedilecektir.

## MATERYAL VE METOT

**Periferik kan kültürü:** Besiyeri Ortamı olarak Rpmi 1640 (100 ml), Fetal Calf Serum (20 ml), Penicilline-Streptomycin (2 ml), L-Glutamine (2 ml), Phytohemaglutinin ( 3 ml ), Kolsemid: 2-3 Damla, Hipotonik: (0.075 M KCl ), 0.56 G Bidistile Su, 100 ml Fiksatif: Glialial Asetik Asit 1 Hacim Methanol 3 Hacim gereken malzemelerdir. Steril enjektöre 0.5 ml heparin çekilir. Enjektör heparinize edildikten sonra hastadan en az 2-3 ml venöz kan alınır. Ekim aşaması laminar flow'da steril koşullarda gerçekleştirilir. Steril konik kültür tüpün üzerine hastanın adı, soyadı , çalışılan yöntem, tarih , saat yazılır. Steril koşullarda içinde besi ortamı bulunan konik kültür tüpüne 9-11 damla damlatılır. Kapak kapatılır. Tüp hafifçe alt-üst edilerek karışımı sağlanır [10]. Bu miktar bebekler için 5-6, kordon kanı için 3-5 damladır. Tüp 37°C etüvde 72 saat bekletilir. 70. saatte (ya da 67-68. saatte) enjektöre çekilmiş kolsemidden 2-3 damla kültür ortamına damlatılır. Tüp içeriği hafifçe karıştırılır. 2 saat (ya da 75 dakika ) 37°C etüvde bekletilir. Tüp etüvden çıkartılarak 10 dakika 1.000 rpm de santrifüj edilir. Tüpün dibinde yaklaşık 1 ml kalacak şekilde supernatant pastör pipeti ile atılır. Dipte çökmüş şekilli elemanlar üzerine 0.075 M KCl solüsyonundan 5 ml eklenir. 20- 35 dk etüvde bekletildikten sonra 1.000 rpm

de 10 dakika süreyle santrifüj edilir. Supernatant atıldıktan sonra hücre kümesinin üzerine mikser kullanılarak soğuk ve yeni hazırlanmış fiksatiften damla damla 5 ml eklenir. Bu aşamada +4° C de bir gece veya -20° C'de 30 dk. bekletilir. Fiksatif ile yıkama işlemi en az 3 kez tekrarlanır. En sonunda hücre kümesi beyaz bir renk aldıktan sonra supernatant atılır. Yaklaşık 0.5 ml kadar bırakılan çökeltinin üzerine 0.5-1.0 ml fiksatif eklenir. Hücreler pastör pipetiyle yavaş yavaş pipetaj yapılarak karıştırılır. Daha önce hazırlanmış soğuk ve ıslak lamlara 45° lik açı ile 3-4 damla damlatılarak yayım sağlanır. Preparatlar bantlanma teknikleri uygulamak üzere kapalı bir yerde saklanır [11-12]. Kuruyan preparatlar Tripsin-Giemsma Bandlama yöntemi ile boyanır. Bu yöntem için gerekenler: PBS solüsyonu (Phosphate buffered saline). PBS hazırlamak için: 1 litre distile su içine 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,319 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O eklenir. A solüsyonu hazırlamak için: 1 litre distile su içinde 9.073 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> karıştırılır. B solüsyonu hazırlamak için: 1 litre distile su içinde 11.87gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O ya da 23.864 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O karıştırılır [13-14]. YÖNTEM: 1) 5 adet şaleye şunlar konur. Birinci şale: 40 mgr Tripsin, 80 ml PBS, İkinci şale: 80 ml PBS, Üçüncü şale: 53 ml A solüsyon, 47 ml B solüsyonu, 2 ml Giemsa boyası, Dördüncü şale : Su, Beşinci şale : Su 2) Preparatların bekleme süresine göre Tripsinde bekletilme süresi deneme preparatları ile belirlenir. 3) 1. Şaleden çıkarılan preparatlar 2. Şalede yaklaşık 15 sn çalkalanır ve Giemsa şalesine konur. 4) Giemsa boyasında 6-10 dakika tutulduktan sonra preparatlar 4 ve 5. şalelerdeki distile sulardan geçirilerek kurumaya bırakılır. 5) Boyanmış preparatların ışık mikroskopunda sayım ve analizi yapılır [15].

## BULGULAR VE SONUÇ

Yöntem kısmında anlatılan standart kültür ve boyama prosedüründe aşağıda belirtilen noktalara dikkat edilirse her preparatta 60-70 adet, çözünürlüğü iyi metafaz alanı elde etmek mümkün olur (Şekil 1).

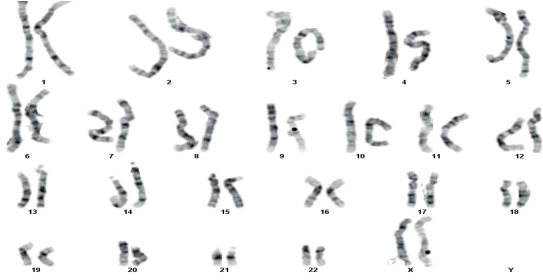
I. Venöz kan alınımında, kan en uygun damardan zorlamadan ideal bir biçimde alınmalıdır. Kan alımı öncesi enjektör heparin ile yıkanmalı, içerisine 0,5 ml heparin çekilmelidir. Kan alınımından hemen sonra enjektör elde aşağı yukarı çevirilerek heparinin alınan venöz kana karışması, homojen hale gelmesi sağlanmalıdır. Mümkün ise alınan kanın o gün içinde ekimi yapılmalıdır. Eğer bekletilecekse +4 C'de saklanması uyundur. Kan prenatal tanı için kullanılacak kordon kanı ise alınmasını müteakip KCl ile fetal-maternal olup olmadığını belirlenmesi için o anda test edilmelidir. Kan kültürünün başarılı olabilmesi için hastanın o esnada kullanmış olduğu ilaçlar ve tedavi varsa bilinmesinde fayda vardır.

II. Kan ekimi laminar flow kabininde yapılmalıdır. Ekim esnasında tüplerin ağzı bek alevinden geçirilmelidir. Kan kültüründe enfeksiyon nadir gözlenen bir durumdur, fakat sterilizasyona dikkat etmekte fayda vardır. Ekimden önce enjektör ucu çıkartılmalı, enjektör ağzındaki 3-4 damla kan dışarı atılmalı, enjektörün pistonu 1 ml hava boşluğu kalacak şekilde geri çekilmeli, bu şekilde hava boşluğu oluşturulan enjektöre ucu tekrardan takılarak, enjektör 5-6 defa yukarı aşağı döndürülerek içindeki kan örneğinin iyice karışması sağlanmalıdır. Bunun nedeni eritrositlere göre çok az oranda bulunan lenfositlerin kan örneği içinde homojen dağılmasının sağlanmasıdır. Kan venöz kan ise 10-11 damla, kordon kanı ise 4-5 damla 5 ml besi yerine ekilmelidir. Ekim sonrasında falkon tüpü ağzı hızlıca bek alevinden geçirilmeli ve beklemeden kapağı kapatılmalıdır. Ekim tüpü 3-4 defa nazikçe yukarı-aşağı çevirilerek karışması sağlanmalıdır. Tüplere isim yazma ekim öncesinde yapılmalıdır. Ekim ya-

pılaca tüp ve içinde kan bulunan enjektör örneklerin karışmasını önlemek için deney tüpü standına arkalı önlü yerleştirilmelidir.

III. Kan ekimi yapıldıktan sonra çıkarım işlemi yapılmaya kadar her gün, günde iki defa falkon tüpleri inkübatörden çıkartılarak 3-4 defa alt üst edilerek hafifçe karışması sağlanmalıdır. Bu şekilde kan kültürünün çökerek üremenin yavaşlaması önlenmiş olur, daha fazla sayıda metafaz alanı elde edilir.

IV. Kan ekiminden 48 saat sonra damlatılarak çıkarım günü metafaz safhasında daha uzun kromozomlar elde edilir, bu sayede yüksek bant seviyesini görmek mümkün olur.



**Şekil 1.** 550-600 bant seviyesinde high resolution bantlama ile hazırlanmış 46 XX kromozom kuruluşuna sahip normal konstitüsyonel karyotip fotoğrafı (orijinal).

V. Kültürün 70. Saatinde 2-3 damla kolsemit eklenir hafifçe çalkalanarak karıştırılır. 2 saat bekletilir, 10 dakika 1.000 rpm de santrifüj edilir, üzeri plastik pipet ile atılır, çökelti üzerine çok fazla sarsmadan vortekslenerek hipotonik eklenir, tekrardan inkübatöre konur. 20 dakika bekletilir. Hipotonik süresi kısa olursa hücre patlamaz kromozomlar iç içe geçer ve boyanma başarısız olur. Hipotonik süresi uzarsa kromozomlar daha şişkin, metafazlar dağılmış halde gözlenir, tam saha elde etmek zorlaşır. Hipotonik çözeltisinin sıcaklığı 37 C olmalıdır. Bu nedenle çıkarım yapılacak günün sabahı hipotonik çözelti inkübatöre konulmalıdır.

VI. Hipotonik süresi dolan kültür tüpleri 10 dakika 1.000 rpm de santrifüj edilir üstleri pipetle atılır, vortexte çok yavaş damla damla soğuk fiksatif (metanol – asetik asit) eklenir. Her 2-3 saniyede en fazla 1 damla fiksatif eklenmelidir. Bu esnada tüp sürekli vortekste spin hareketi yapıyor olmalıdır. Tüpün dibindeki çökelti ve fiksatif karışımı 1,5 – 2 ml olunca kadar fiksatif yavaş eklenmelidir. Bütün tüplerin ilk 1,5 – 2 ml'lik fiksatif ekleme işlemi bitince ikinci fiksatif ekleme turuna geçilmelidir. İkinci turda fiksatif biraz daha hızlı eklenebilir. Tüplerin içindeki çözelti 5 ml olunca tüpler, tüp sporu içinde -20 C'de derin dondurucuya konulmalıdır. En az 1 gün derin dondurucuda bekletilen örnekler 1.000 rpm de santrifüj edilip üstleri pipetle atıldıktan sonra üzerine soğuk fiksatif eklenerek yıkanmalıdır. Tüp içerisindeki çözelti tamamen saydamlıncaya kadar yıkama işlemi 2-3 defa yapılmalıdır.

VII. Yayma yapılacak günün öncesinde lamlar distile su içinde şalelere yerleştirilmeli ve -20 C donmaları sağlanmalıdır. Donmuş lamların şaleden çıkarılabilmesi için yaymadan 1 saat önce çıkarılan şalelerin kısmi çözülmesi sağlanmalıdır. Lamlar oldukça soğuk olmalıdır. Aksi takdirde yapışma gerçekleşmez.

VIII. Yaymadan önce tüpler 1.000 rpm de santrifüj edilip üstleri pipetle atılmalıdır. Tüp içinde 2-3 mm kalınlığında krem rengi çökelti üstünde 1-1,5 ml fiksatif bırakılmalıdır. Plastik pipetle 4-5 defa pipetaj yapılarak çökeltinin fiksatifte homojen çözülmesi sağlanmalıdır. Sonrasında 40-45 cm yüksekten soğuk lam üzerine Z çizerek damlatılmalıdır. İn-

kübatör tepsisine yerleştirilen yayılmış lamaların inkübatörde kuruması sağlanmalıdır. Çok fazla h-kuruyan preparatlarda kromozomlar çubuk görünümünde olur ve boyama sonrasında bant gözlenmez, tamamen koyu renkte olur. Az kuruyan preparatlarda kromozomların kenarları ipliksi çıkıntılı rulo fırça görünümünde, şişkin olarak gözlenir. Bant oluşmaz.

IX. Boyama esnasında preparatlar oda sıcaklığında olmalıdır. Preparat sıcaklığı tripsin süresi için önemlidir. Tripsin süresi uzarsa kromozomlar tamamen eriyeceği için silik bir görüntü oluşur, kısa tutulursa yeterince bantlaşma gözlenmez. Tripsin çözeltisi boyama günü sabah taze hazırlanmalıdır. Tampon çözeltisi içinde çözünen enzim solüsyonu boyamadan 3-4 saat önce 37 C'de inkübatörde bekletilmelidir. Her laboratuvar tripsinde bekletme süresini kendi koşullarına göre belirlemelidir.

X. Hücre kültüründe kullanılan besiyerlerinin saklanmasına ve tarihlerine dikkat edilmelidir. Son kullanma tarihi yaklaşan besiyerlerinin daha verimsiz olduğu görülmüştür. Besiyerlerinin rengine dikkat etmek gerekir, özellikle sarı renge kayanlarda hiç üreme olmamaktadır. Aslında besiyerinin pH değerini gösteren boya indikatörleri pH değişen besiyerleri hakkında kullanıcıyı uyarılmaktadır. Vakti dolmaya yakın besiyerlerine L glutamin eklemekte fayda vardır. Hipotonik, tampon, boya, fiksatif çözeltileri hazırlanırken üzerine hazırlanma tarihi not düşülmelidir. Laboratuvarında kullanılan distile suyun saflığından ve cam malzemelerin çamaşır suyu, deterjan ve mineral kalıntısı içermediğinden emin olunmalıdır. Cam malzemeler çeşme suyundan geçirildikten sonra mutlaka distile sudan geçirilmelidir.

## TARTIŞMA

Klinik sitogenetik çalışmaları, kromozomların sayısal (trizomiler), yapısal (inversiyon, translokasyon, ring kromozom, izokromozom) anomalilerini, belirli bir seviyeye kadar delesyonları, kromozom varyasyonların belirlenmesi sağlar. Bu sayede büyük oranda prenatal tanıya yardımcı olurken, infertilite hastalarının durumlarının netleştirilmesinde veya bu hastalara uygun genetik danışma verilmesini sağlar. Sitogenetik sonuç bütün kromozomlara aynı anda bakma fırsatı verdiği için kapsayıcı ve klinik açıdan çok önemlidir. Fakat 800 bant seviyesinde dahi mikrodelesyonları görmek mümkün olmadığı için, delesyonlar bu sonuç ile ekarte edilemediği için hastanın durumuna göre moleküler genetik yöntemleri ile desteklenmesi gerekebilir fakat genetik tanıda ilk ve mutlaka başvurulması gereken yöntemdir. Bu nedenle özellikle periferik kan kültürü laboratuvarında yoğun olarak çalışılmaktadır. Periferik kan kültürünün aşamalarının inceliklerinin iyi bilinmesi, hastaların tekrara gitmemesi, yeterli alan olmasından dolayı sonucun hızlı çıkması laboratuvar çalışanlarının yükünü azaltacak ve zaman israfının önüne geçecektir. Bu çalışmada süreler her laboratuvar için değişiklik gösterebilir, bu nedenle her merkez kendi iklim koşullarına göre, laboratuvarında kullandıkları alet ve ekipmanların durumuna göre prosedürü optimize etmelidir.

## KAYNAKLAR

- [1] Lewis R 2007. Human genetics: Concepts and applications. 7th Edition, McGraw Hill, New York, USA.
- [2] Lewis R 2012. Human genetics: Concepts and applications. 10th Edition, McGraw Hill, New York, USA.
- [3] Thieman WJ and Palladino MA 2012. Introduction to biotechnology. Pearson, Boston, USA. PMCid:PMC3354769

[4] Hartl DL and Ruvolo M 2011. Genetics: analysis of genes and genomes. 8th Edition, Jones and Bartlett Learning, Burlington, Massachusetts, USA.

[5] Miglani GS 2008. Fundamentals of genetics. Alpha Science International Limited, Oxford, UK. PMID:19075051  
PMCID:PMC2663096

[6] Russell PJ 2006. iGenetics: A molecular approach. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, California, USA.

[7] Smith JE 2009 Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge, USA. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511802751>

[8] Snustad DP and Simmons MJ 2012. Genetics. 6th Edition. International student version, John Wiley and Sons, Singapore, Singapore.

[9] Strachan T and Read A 2010. Human molecular genetics. 4th Edition, Taylor and Francis Group, Garland Science, New York, USA.

[10] ACT Laboratory Procedure Manual, 1980, section 2, pgs.70-77 and 2nd edition, 1991, chapter 2 pg 24-30.

[11] Panda SK, Ravindran B 2013. In vitro Culture of Human PBMCs. Bio-protocol 3(3): e322. DOI: 10.21769/BioProtoc.322.

[12] Panda SK, Kumar S, Tupperwar N, Vaidya T, George A, Rath S. 2012. Chitohexaose activates macrophages by alternate pathway through TLR4 and blocks endotoxemia. PLoS Pathog 8(5): e1002717.

[13] Dulbecco R. et al. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. In: J. Exp. Med. vol. 99 (2), pp. 167-182. PMID 13130792

[14] Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, volume 3, apendix B.12

[15] Portions of this article are from “Phosphate buffered saline. In Wikipedia, the free encyclopedia. Retrieved September 17, 2008, from [http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate\\_buffered\\_saline](http://en.wikipedia.org/wiki/Phosphate_buffered_saline).” This article has been reviewed for scientific accuracy and is used in accordance with Wikipedia’s GNU Free Documentation License (GFDL).