

Transmission Elektron Mikroskobu

Kübra Asena TERİM KAPAKİN

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı –ERZURUM

Sorumlu Araştırmacı, kbraterim@yahoo.com.

Özet: Elektron mikroskobu (EM) görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. EM büyük bir alan derinliğine sahiptir, yüksek büyütme yapar. Görüntünün kalitesi, netliği ve detay zenginliği rezolüsyona bağlıdır ki EM’da rezolüsyon gücü 2-20 angstromdur. Transmission Elektron Mikroskobu biyoloji (botanik, hücre biyolojisi), tıp, madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 600.000 kez büyüterek iç yapılarını görüntüler.

Anahtar kelimeler: Transmission elektron mikroskobu, fiksasyon, boyama.

Transmission Electron Microscopy

Summary:The electron microscope (EM) is a scientific instrument that utilizes beam of electrons, rather than light, to image a specimen. EM have a large depth of field and provide a high level of magnification. The quality, clarity and opulence of details of the image are dependent on resolution, and the resolution achieved by EM ranges between 2-20 angstroms. The Transmission Electron Microscope (TEM) magnifies specimens pertaining to biology (botanic, cell biology), medicine, matter sciences and earth sciences, 600 000 times, and images the inner structure.

Key words: Transmission electron microscopy, fixation, stain.

Elektron mikroskobu (EM) görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. EM’nun ışık mikroskobuyla (IM) karşılaştırıldığında birçok avantajının olduğu görülür. EM’da IM’nun aksine aydınlatma kaynağı olarak ışık yerine vakum içinde hızlandırılmış elektron demeti kullanılır. IM’da genellikle boyanmış preparatlar ışığın, örneğin içinden geçmesi yolu ile incelenerek, tıp ve mühendislik gibi birçok alanda kullanılır. Ancak atom gibi çok küçük cisimcikleri görmemiz için gerekli olan yüksek büyütmeleri veremezler. EM ise; yüksek büyütme yapar. Büyük bir alan derinliğine sahiptir, yani yüksek rezolüsyonlu görüntüler oluşturur. Görüntünün kalitesi, netliği ve detay zenginliği rezolüsyona bağlıdır ki IM’nun rezolüsyon gücü 0,5-1 mikron iken EM’da bu oran 2-20 angstromdur (1,3,9,16). İlk EM’u Knoll ve Ruska tarafından Almanya’da geliştirilmiş (3,12,14). EM’nun, Transmission Electron Microscopy (TEM) ve Scanning Electron Microscopy (SEM) olmak üzere iki temel tipi vardır. Daha az kullanım alanına sahip Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)’da üçüncü tipi olarak bilinmektedir (3,9,17).

TEM: Biyoloji (botanik, hücre biyolojisi), tıp (Adli Tıp, anatomi, mikrobiyoloji, biyokimya, fizyoloji, toksikoloji, patoloji), madde bilimleri ve yer yüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 600.000 kez büyüterek iç yapılarını görüntüler. İncelenecek örneklerin ultramikrotomla 60 nm kalınlığında ince kesitleri alınır. Bunlardan dokunun ultrastrüktürel düzeyde incelenmesi yapılır. Hücre organelleri, yapı taşları, mikroorganizmalar, hücre zarı ve hücrenin çekirdeğine bakılır (1,3,15). İki boyutlu bir görüntüyü fosforluoresan ekran üzerinde oluşturmak için, elektronları örneğin çok ince kesiti içinden geçirir. Görüntünün özel bir alanının parlaklığı örneğin içinden geçen elektronların sayısı ile orantılıdır (3,9,16).

EM’de Örnek Alma

İlk adım kullanacağımız örnekleri uygun bir şekilde almak ve onları hazırlamaktır. Bunlar bitki, insan veya hayvanlardan alınan örnekler olabileceği gibi bakteri, virus gibi hücre elemanları ve çok çeşitli yüzeyler de olabilir. Örnek boyutları fiksasyon için uygun (5x5 mm) boyda olmalıdır (1,3,6,16).

EM'de Fiksatifler ve Fiksasyon

Fiksasyon EM için biyolojik örneklerin hazırlanmasındaki ilk basamaktır. Amacı, alınan örneği canlı organizmayla karşılaştırıldığında mümkün olduğunca en az farklılık oluşturacak şekilde hazırlamak ve örnekten bloklar oluşturmaktır. Dehidrasyon, gömme ve elektron demetine maruz kalmada bile ultrastrüktürel ilişkilerin korunduğu şekle getirip sabitlemeyi amaçlamaktadır (1,2,3,4,5,16).

EM Fiksatiflerinin Geliştirilmesi: IM için kullanılan fiksatiflerinin çoğu EM için yetersizdir. İlk EM çalışmalarında fiksasyon için IM'da kullanılan formaldehit denenmiş fakat yeterli sonuç alınamayınca 1950'lerde osmik asit kullanılmaya başlanılmıştır. Osmium tetra oksit (OsO_4) EM'de fiksatiflerin temelini oluşturur. OsO_4 'le lipitler ve karbonhidratlar çok iyi bir şekilde tespit edilirken, proteinlerin çoğunluğu tespit edilmez ya da parçalanır. Bu yüzden de enzim araştırmalarında primer fiksasyon için kullanılamaz. Kesiti alınan örneklerin boya maddelerine karşı affinitesini artırır. Dokulara çok yavaş işlediğinden örnekler çok küçük olmalıdır. OsO_4 ve sonrasında potasyum permanganat hem zarlar hem de bitkiler için alternatif fiksatiflerdir (1,3,5,10,13). 1963'de Sabatini ve ark. (15) primer fiksatif olarak aldehit kullanımını özellikle de gluteraldehiti, sekonder fiksatif olarak da OsO_4 kullanımını önermişlerdir. Günümüzde en çok kullanılan ve en çok tercih edilen bir fiksatif gluteraldehit olup bunun başlıca sebebi ise gluteraldehitin karbonhidratlar, proteinler ve enzimlerin çoğunu fikse edebilmesinden kaynaklanmaktadır. Gluteraldehitin bunların yanında lipitleri iyi fikse edememesi ve bunlarla tespit edilmiş örneklerin boyaları yeterince alamaması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu yüzden aldehitle fiksasyondan sonra OsO_4 'le postfiksasyon zorunluluğu vardır (1,3,5,13,16). Tersiyer fiksatif olarak uranil asetat kullanılabilir ki özellikle lipitler için iyi bir fiksatifdir (5).

Tampon Çözeltiler: EM'da sıklıkla Fosfat, Cacodylate, Veronal acetate, Collidine tamponlar kullanılır (1,3,5,6,16). Fosfat tamponlar hariç diğerlerinin insanlar ve EM cihazı üzerine yan etkileri vardır. Günümüzde en çok monobazik-dibazik sodyum fosfat karışımı olan Sörensen tamponu kullanılmaktadır (3,5,8,16).

Tamponların pH'sı: EM fiksatifleri tamponlarla nötral pH'da tutulmaya çalışılır (3,5). Çoğu fiksatifler pH 6,5-8 arasındadır. Albumin için pH 7 veya daha az, nükleer materyal ve akromatik demetler için ise pH 6 civarlarında olmalıdır (2,3,5,8,16).

Osmolarite: Hipertonik ortam veya fiksatifler hipotoniklerden daha az zararlıdır. Fiksatifin osmolaritesi tampon konsantrasyonu değiştirilerek ayarlanabilirken, glukoz-sükroz ve Na-kolloid de eklenebilir. Glukoz ve sükroz albuminin iyi fiksasyonuna izin vermeyeceği için primer OsO_4 fiksatifleriyle kullanılmamalıdır. Sekonder OsO_4 ve gluteraldehit fiksatiflerle uyumludurlar. Sodyum klorid tampona pH tam oluşturmadan eklenmelidir. Aksi takdirde pH değişikliğe uğrar. Gluteraldehit ve formaldehit osmolarite de inaktiflerdir (3,5,8,16)

Primer Fiksasyon: Fiksasyon zamana, ısıya, örneğin boyutuna ve fiksatifin yapısına bağlıdır. Veronal acetate ve collidine tamponlar primer fiksasyonda daha üstündürler. İzole hücreler birkaç dakikada, tüm dokular saatler içerisinde fikse olurlar. Özellikle ısı çok düşükse OsO_4 'le primer fiksasyon için 0 °C'de 2 saat uygundur. Aldehitler içinde buna yakın bir süre gereklidir. Aldehitlerle fiksasyonda lipitlerin yıkımına yol açacağından bu süre uzatılmamalıdır (1,3,5,16). Aldehit- OsO_4 'le fiksasyonda ise ısı değişikliği 0-25 °C'de çok az yapısal değişiklik oluşur. Ancak mikrotübüller düşük ısıda korunamazlar. Yüksek ısıda mitokondriler de büzüşme ve sitoplazmada granülarite oluşur. Isının 0-4 °C sınırlandırılması aktiviteyi de sınırlar. OsO_4 , gluteraldehit ve potasyum permanganatla çok kısa başlangıç fiksasyonundan sonra oda ısısında ana fiksasyon önerilir (1,2,3,5,6,13,16).

Yıkama: Birden fazla fiksatif kullanılacaksa ilk maddenin fiksasyona katılmayan kısmı yıkanır. Yıkama özellikle aldehit sonrası OsO_4 kullanılacaksa önem taşımaktadır. Çünkü her iki madde de birbirleriyle etkileşmektedir. Bunların yanısıra çok sayıda örnek için yıkamadan kaçınılmalıdır. Örneğin: sinaptik veziküller, sükrozlu cacodylat tamponda 30 dakika bekletilirse düzleşmeye başlarlar (1,4,3,5). Yıkama nedeniyle oluşan artefaktlar gluteraldehit- OsO_4 kombine olarak kullanıldığında önlenemez. Genellikle 4 °C'de, pH 7,4'de 2 saat içerisinde 3 kez yıkama solüsyonu değişimi uygulanır (1,3,5,6,8,13,15). Gluteraldehit ile fikse edilen örnekler, fiksasyon sonrası gece boyunca yıkama solüsyonunda bırakılabilirken formaldehitle fikse edilen örnekler bırakılamaz, çünkü formaldehit

dokularda reversible reaksiyona girer. Yıkama fiksasyonla aynı ısıda yapılmalıdır. Yıkama solüsyonunun osmolaritesi fiksatifinkinden farklı olmalıdır. Çünkü fiksasyonda zarın osmotik yapısı genellikle değişir (3,5).

Sekonder Fiksasyon: Süre ve ısı primer fiksasyondan daha az önemlidir. En çok %1'lik OsO_4 'le fikse edilirler ve primer fiksasyonda kullanılan tampon çözelti burada da 4 °C'de veya oda ısısında bir saat süreyle uygulanır (1,3,5,13,16).

Organ ve Dokuların Fiksasyonu:

1) **İmmersiyon fiksasyonu:** Deri gibi kan akımının kesilmesine dayanabilecek dokular in vitro olarak immersiyon yöntemiyle fikse edilebilirler. Alınacak dokunun büyüklüğü fiksatife ve doku yoğunluğuna göre değişir. Primer fiksasyon için en fazla 0,5 mm'lik küplere kesilir. Aldehit fiksasyonunda ise örnekler biraz daha büyük olabilir.

2) **İn vivo fiksasyon:** Denek anestezi altındayken doku ortaya çıkartılır. Fiksatif dokunun içine ya da üstüne damlatılır. Damlatma tekniği, yeterince penetrasyon olmadığından yalnızca yüzeysel tabakalar incelendiğinde etkilidir. Fiksatif 10-20 dakika süreyle sürekli olarak damlatılır ve fazlası emdirilir. Burada temel olarak veronal asetat tamponlu OsO_4 % 1-2'lik konsantrasyonda kullanılır. Sonrasında primer fiksasyon immersiyon yöntemindeki gibi devam ettirilir. Oda ısısında ya da soğuk ortamda 1-4 saat sürdürülür. Bu tekniğin dezavantajı anestezi maddenin doku hasarı oluşturma olasılığıdır (3,5,6,16).

3) Perfüzyon fiksasyonu:

a) **Anestezi tipi:** Rat, fare, hamster gibi küçük deneklerde eter veya halotan kullanılır. Daha büyüklerde ise nembotal, kloral hidrat, urethan intraperitoneal ya da intravenöz kullanılır.

b) **Perfüzyon sıvısı vermek:** Bu yöntem denek büyüklüğü, doku ve uygulayıcının yeteneğine bağlıdır. Ör; küçük hayvanlarda en uygun yöntem aortadan perfüzyon sıvısının verilmesidir (3,5).

Perfüzyon sıvısı ve fiksatifler: Fiksatifin ısısı arttıkça fiksasyon daha hızlı ve etkilidir. Enzim histokimyası için fiksatif oda ısısında olmalı, labil enzimler için 0°C'da bir ısı gereklidir. Vücut ısısının altındaki değerlerde perfüzyon sıvıları vazokontrüksiyona yol açıp perfüzyon etkinliğini bozabilir (3,5,16).

Dehidrasyon

Dehidrasyonun asıl etkisi örneklerden lipitlerin çıkarılmasıdır. Bu oran %95'i bulur. Proteinlerin ise % 4'ü çıkarılır. Bu oranlar fazla olursa dokuların hücre ve hücre içi yapıları büzüşür (3,5).

Dehidrasyonda kullanılan ajanlar: Aseton, etanol, etilen glikol, polietilen glikol ve propilen oksid'tir. Bunlar içerisinde en fazla tercih edilen etanol ve aseton'dur. Aseton, beyin dokusunun dehidrasyonunda hücreyi daha iyi koruduğu için etanole göre daha çok tercih edilir. Gömme materyallerinden polyester resin etanolde çözünmediği için aseton içinde dehidrate edilir. Epoksi resinler, etanol ve asetona göre propilen okside daha kolay çözünmediğinden dehidrasyonunda en çok propilen oksid kullanılır (3,5,6,8,16). Dehidrasyon öncesi örnekler OsO_4 ile fikse edilirse, kullanılması gereken ajan yerine yanlış ajan kullanılması, dehidrasyon işlemi düşük ısıda ve yüksek hızda yapılırsa dokulardan lipidlerin uzaklaştırılması azalır (2,3,5,16).

Standart Dehidrasyon İşlemi: Dehidrasyonda kullanılacak çözeltinin miktarı numune hacminin 10 katı olacak şekilde kullanılır. Dehidrasyon oda ısısında yapılmalıdır. Şayet dehidrasyon soğukta başlamışsa ısı oda ısısına yükseltilir (1,3,5,16).

TEM'de Dehidrasyon çizelgesi:

% 25, % 50, % 75, % 96 (iki kez), % 100'lük etanol de (iki kez) 15-20 dk

Propilen oksit içinde (iki kez) 15 dk (1,3,5,6,8,10,16).

Dehidrasyon Çeşitleri: Dehidrasyonun hızlı ve parsiyel olmak üzere iki şekli vardır.

Hızlı dehidrasyon süreçleri hızlandırmak gerektiğinde uygulanır. Çözeltiler daha sık değiştirilir. Daha küçük örnek kesitleri alınır. Parsiyel dehidrasyonda % 30'luktan % 70'lik etanole kadarki basamaklar uygulanır (3,5,16).

TEM'de Gömme İşlemi

Örnek hazırlamadaki son aşama ince kesit almaya uygun yapılara infiltre olabilen ve daha sonra polimerize olarak katılaşabilen sıvı gömme ortamı hazırlamaktır.

TEM için gömme ortamının özellikleri: Uniform ve polimerize olmalı, dehidre edici ajanlarla kolay çözünmeli, daha akışkan olmalı, polimerizasyon ile çok az hacim değiştirmeli, kolay kesit alınabilmesi, elde edilmesi kolay olmalı, elektron bombardımanı altında stabil olmalıdır (3,5,16). Genellikle Epoksi

resin, polyester resin, metacrylate olmak üzere üç tür gömme ortamı kullanılır.

Epoksi Resin: Uniform olarak polimerize olur. Çok küçük hacim değiştirir. Elektron bombardımanı altında stabildir. Ancak uzun bir infiltrasyon süresine sahip ve yüksek viskoziteli olması da dezavantajlarıdır (1,3,5,6,7,16).

Epoksi Resin Karakteristikleri: Epoksi resinler arasındaki farklar viskozitelerinden kaynaklanmaktadır. Viskozitesi yüksek ortamlarda, infiltrasyon süresi artacağından düşük viskoziteliler tercih edilir. Ayrıca epoksi resin gömme ortamına hızlandırıcı eklenmesi de ortamın viskozitesini artırır. Bunun yanında gömme ortamının viskozitesini, sertleştiricinin viskozitesi de etkiler (7,8).

Polyester Resin: Epoksi resin gibi iyi özelliklere sahiptir. Ancak stabil olmaması ve zor temin edilmesi nedeni ile daha az kullanılır. Metacrylate ise daha çok histokimyasal çalışmalarda kullanılır(3,5,6,7,16).

Standart Gömme Yöntemi: Dehidrasyonun son aşamalarında iken taze olarak hazırlanan gömme karışımları infiltrasyon için kullanılır. Örnekler çözeltilerden aşamalı bir şekilde geçirilir ve en son gömme karışımı tarafından dehidre edici ajanlar uzaklaştırılana kadar bu süreç devam eder. Dehidrasyon ajanları bir pipetle alınarak gömme karışımı ile 1/1 oranında karıştırılır. Bir saat sonra bu karışım saf gömme ortamı ile yer değiştirilir ve şişeler kapalı olarak bir gece bekletilir. Standart gömme yönteminde jelatin ve polietilen kapsüller gömme kalıpları olarak ince kesitler almak için kullanılır. Örnek kapsülün altına yerleştirilir. Kapsül yarısına kadar en son gömme karışımı ile doldurulur. Gömme ortamı kapsülün ısıtılması veya UV ışını ile polimerize edilir (3,5,16).

Oda Isısında Gömme: Burada kullanılan karışım; Epon 812, MNA, Thorokol CP-8, DMP-30 'dir (3,5,6,16).

Hızlı Gömme: Hızlı gömme yöntemi hızlı dehidrasyondan sonra kullanılır. Örneklerin (>0,1 mm) boyutu küçük tutulur. Örnekler Epon 812 ya da Araldite 502'ye gömülür. Bir propilen oksit, iki epoksi resin (1/2) oranında kullanılarak 5 dakika karıştırılır. Sonra örnek kapsülün merkezine alınır ve infiltrasyon su aspiratöründe maksimum vakum altında 5 dakika içinde tamamlanır.

Polimerizasyon 95 °C 'de 40 dk-12 saat içinde gerçekleşir (3,5,16).

Özel Gömme Yöntemleri: Fibriller, düz örnekler ve tek sıra oluşturmuş hücreleri gömmek için kullanılır (1,4,5).

En Son Blok Sertliği: Gömme ortamında kullanılan bütün kimyasallar en son blok sertliğini etkiler. Plastikleştirici ya da fleksibilizer eklenerek en son blok sertliği azaltılabilir. Bunların oranları değiştirilerek sertlik derecesi ayarlanabilir. Gömme materyali dokudan daha sert ise kesitler parçalanır, dokudan daha yumuşak ise kesitler ondulalı bir şekilde elde edilir (1,3,5,6).

Kesit Alma Özelliği

Anhidrit/epoksi oranı: Kesit alma olanakları en son bloğun yalnızca sertliğine değil polimerizasyon sırasındaki çapraz bağların miktarı ve doğasına bağlıdır. Düzlemsel ve birkaç çapraz bağ içeren kısa polimerler kesit almada kolaylık sağlar. Anhidrit oranı düşürülerek kesit alma daha kolaylaştırılır (3,5,16).

TEM'de Kesit Alma

Epoksi resin gömme materyaline gömüldükten sonra etüvde 48 saat bekletilerek hazırlanmış olan örneklerin, IM'da ve EM'da incelenebilmeleri için yarı ince kesitlerinin, TEM'de incelenebilmeleri için de ince kesitlerin alınması ve boyanması gerekir. Kesit almak için etüvden çıkarılan blokların üzerindeki jelatin sıcak su ile giderildikten sonra EM için gerekli olan ince kesitler alınmadan önce, yarı ince kesitler alınır. Yarı ince kesitlerde ideal olması gereken kalınlık 2 µm'dir. Alınan yarı ince kesitler üzerinde birkaç damla distile su bulunan lam üzerine alınarak sıcak tablada ısıtılır. Büzüşen yarı ince kesitlerin buruşuklukları açılarak dokunun görünür hale gelmesi sağlanır. Daha sonra ısınmış olan distile su dökülerek kesitin kuru bir zemine yapışması sağlanır. Kuru zemine yapışmış olan yarı ince kesitler metilen mavisi ile boyanır. Lam kurumaya bırakılır ve boyanmış olan preparatlar ışık mikroskobunda incelenir. İncelenen dokunun ışık mikroskobik çalışması amaçlanmamış olsa bile, yarı ince kesit almanın temel amacı: doku hakkında bilgi sahibi olmak ve ince kesit almamız için gereken yüzeyi saptayarak doku üzerinde bu kısmın elde edilmesini sağlamaktır. İnce kesitler havuzlu cam bıçak veya elmas bıçak ile alınır. Dokunun havuzlu cam bıçak ile alınmaması, örneğin fiksasyonundaki bir hataya bağlı olarak görülür. İdeal ince kesit kalınlığı 60 nm civarında olmalıdır (1,2,3,6). Havuzda biriken uygun kalınlıktaki kesitlerin buruşukluklarının açılması için bunların ksilolleme işleminden

geçirilmesi gerekir. Ksilolleme işleminde, ksilol bir sulu boya fırçası yardımıyla dokulara yaklaştırılmalı ve kokusu ile dokunun buruşukluklarının açılması sağlanmalıdır. Ksilolleme işleminden sonra örneklerin bakır gridlerin mat yüzlerine toplanması gerekir. Daha sonra kesit alınan gridler kurutulmalı ve grid boksaya yerleştirilmelidir. İnce kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat boyaları ile boyanarak TEM’de incelenir (3,6,16).

TEM’de Kontraslama

İM’da görüntü, biyolojik örneklerin bazı dalga boyundaki ışınları tutarken bir kısmını göze yansıtması yoluyla elde edilir. EM’da ise renk yoktur çünkü tek dalga boyunda ışın kaynağı kullanılır (3,9,16). Bu durum insan gözü tarafından ayırt edilmeyi güçleştirir. Bu yüzden örneklerin boyanmasıyla kontrast artırılarak daha iyi görüntü elde edilmeye çalışılır (3,11).

I. Pozitif Kontraslama

Pozitif kontrastlamada en sık uranil asetat ve kurşun kullanılır. Etki mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte uranil iyonlarının fosfo/amino gruplarına bağlanması sonucu nükleik asit ve proteinlerde kontrast olduğu görülmüştür. Kurşun ise (-) değerlikli komponentlere ve osmiumun reaksiyona girdiği bölgelere bağlanır (3,11,16).

1. Gömme öncesi uranil tuzlarıyla pozitif kontrastlama: Gömmeden önce ya da sonra yapılabilir. Önce yapılırsa: membran korunur, fiksasyon sağlanır. pH 5,2 civarında tutulmaya çalışılır. Böylece DNA, mitokondri, miyofibril, nükleoprotein ve fosfolipit yapıları korunur. Özellikle aldehit/osmium fiksasyonundan daha iyi sonuç alınır (1,3,4,11). Dokular aldehit ve osmiumla fikse edildikten sonra iki kez distile edilmiş suda 3 kez 15 dk. bekletilir. Daha sonra uranil asetatın iki kere distile edilmiş sudaki %0,5-2 ‘lik çözeltisinde oda sıcaklığında 1-2 saat bekletilir. Dehidrasyon işlemine geçilir (3,11,16). Gömme öncesi doku uranil tuzlarıyla boyandıktan sonra da kesitlerin kurşunla boyanması önerilir (1,3,4,11,16).

2. Gömme sonrası uranil tuzlarıyla pozitif kontrastlama: Sulu ya da alkoldeki çözeltiler kullanılarak, farklı yöntemlerle boyama yapılabilir (3,4,11,16).

Sulu çözeltiler: % 2’lik uranil tuzu çözeltisi kullanılır. Filtre kağıdına distile su emdirilip petri kutusuna yerleştirilir. Islak filtre kağıdı üzerine parafilm konur ve üzerine birkaç damla çözelti damlatılır. Gridler doku kesitleri alt yüzeyde olacak şekilde damlaların üzerine yerleştirilir, petri kutusunun kapağı kapatılır. 15 dk. ile birkaç saat beklenir. Bu sırada güneşten korunulmalıdır. Ortamın sıcaklığı artırılarak (40-60 °C) boyama süresi kısaltılabilir. Gridler distile suda yıkanır. Hemen ya da daha sonra kurşunla boyanır (1,3,11,16).

Alkoldeki çözeltiler: Bazı sıkı bağlı resinler sulu çözeltilerle iyi boyanmazlar. Penetrasyonu artırmak için ağır metallerin alkoldeki (etanol, metanol) çözeltileri kullanılır. Alkolün hızla buharlaşmasını önlemek için sulu çözeltilerle boyamada kullanılabilecek bir odacık kullanılır, ondan farklı olarak filtre kağıdına distile su yerine alkol emdirilir. En sık uranil asetatın etanoldeki %2-4’lük çözeltisi ve %50’lik doymuş çözeltisi kullanılır. Uranil tuzları yavaş çözüldüğünden doymuş çözelti en az bir gün önce hazırlanmalıdır. Kullanmadan hemen önce 15-20 dk. santrifüje edilir. Buharlaşmayı önlemek için tüpün ağzı sıkıca kapatılır. Resinin türüne bağlı olarak boyama süresi 5-15 dk. ile birkaç saat arasında değişir. Boyama bittikten sonra gridler %50’lik etanol serilerine batırılır. Alkole batırma işlemi hızla yapılmalıdır, çünkü alkol çabuk buharlaşır ve bu da uranyum tuzlarının çökmesine neden olur. Son kez alkole batırılarak filtre kağıdının üzerine yerleştirilerek kurumaya bırakılır (3,11,16). Metanoldeki çözeltilerle boyamada benzer şekilde yapılır, etanoldekenden farkı %25’lik çözelti kullanılmasıdır. Alternatif olarak uranil asetatın metanoldeki %2’lik çözeltisine %1 Dimetilsülfoksit (DMSO) eklenerek de boyama yapılabilir, ancak DMSO uranyum iyonlarının deriden geçişini kolaylaştırdığı için mutlaka gerekli önlemler alınmalıdır (1,3,16).

3. Gömme sonrası kurşunla pozitif kontrastlama: Uranil’le boyamadan sonra kurşun sitratın iki kez distile edilmiş sudaki çözeltisiyle boyama yapılabilir. Kurşun boyalar CO₂ ile temas ederse hemen presipite olur. Bu nedenle çözeltiyi saklama ve boyama aşamalarında CO₂’den uzak tutmak gerekir. Bu amaçla uranille boyamadakine benzer bir odacık kullanılır, ancak filtre kağıdı ortamdaki CO₂ uzaklaştırmak için 1 N NaOH ile ıslatılır. Grid önce petri kutusunun içine damlatılan CO₂’siz suyun üzerinde doku alt yüzeyde olacak şekilde birkaç

Transmission Elektron Mikroskobu

saniye bekletildikten sonra kurşun sitrat damlasının üzerine yerleştirilir. Kurşun sitratta 15-30 saniye bekletildikten sonra 25 kez CO₂'süz iki kez distile edilmiş suya ya da 0,01 N NaOH'a daldırılır. Daha sonra tekrar CO₂'süz iki kez distile edilmiş suya ve ardından iki kez distile edilmiş suya 25'er defa daldırılır. Bu işlemden sonra örnek filtre kağıdının üzerine yerleştirilerek kurumaya bırakılır. Kuruyan örnek TEM'de incelemeye hazırdır (3,11,16).

II. Negatif Kontraslama

Makromolekülün kendisi boyanmazken çevresi yoğun boyanır. Sonuç olarak örnek koyu zeminde açık renk olarak görülür. Kesitlerde kullanılmaz ancak bütün haldeki biyolojik

yapıların (virus, bakteri, hücre organelleri vb.) incelenmesinde kullanılır. Örneği desteklemek için Collodion ya da Formvar substratları kullanılır. Sıklıkla fiksasyon yapılmaz, örneğin çevresi basitçe boyanır ve kurutulur. Buna rağmen kalın gömme materyalleri kullanılmadığı için kesitlerdekinden daha iyi bir çözünürlük elde edilir (3,4,11,16).

Negatif kontrastlama tekniği basit ve hızlı olmasının yanı sıra fazla araç gereç ve deneyim gerektirmez. Hücre organellerinin değerlendirilmesinde ve bazı viral enfeksiyonların hızlı klinik tanısında kullanılır (1,3,4,11). Boya, örnekteki girintileri tam olarak doldurarak ayrıntılı olarak incelenmesine olanak verir. Uranyum tungsten ve molibden gibi ağır metal tuzları kullanılır (3,11,16).

KAYNAKLAR

1. Benjamin F T , Raymond T J (1978): Diagnostic Electron Microscopy. Vol: 1. New York. John Wiley and Sons, Inc.

2. Bharatan S, Desroches K S (1997): Transmission Electron Microscopy Charaterization of Lattice Damage. Erişim: <http://www.info.newcastle.edu.au> Erişim Tarihi: 12.05.2002.

3. Bozzola J J, Russell L D (1998): Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologist. 2 th Edition. London. Jones and Bartlett Publishing, Inc.

4. Ghadially F N (1982): Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix. 2 th. Edition. London..

5. Glauert A M (1975): Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. New York. American Elsevier Publishing Co., Inc.

6. Glauert A M, Lewis P R (1998): Biological Specimen Preparation for Transmission Electron Microscopy.. Erişim: editorial @ portlandpress.com Erişim Tarihi: 03.05.2002

7. Glauert A M, Rogers G E (1956): A new embedding medium for electron microscopy. Nature. October: 803.

8. Hayat M A (1978): Principles and Techniques of Scanning Electron Microscopy Volum 6. New York. Litton Educational Publishing, Inc.

9. Iowa State Universtiy What is the EM? (1999): Erişim: <http://www.mse.iastate.edu/microscopy/uses.html> Erişim Tarihi: 12.04.2002

10. JOEL LTD. Questions and Answers on Snanning Electron Microscope (1999): Erişim: <http://www.jeol.com/external.html> Erişim Tarihi: 26.03.2002.

11. Lewis P R, Knight D P (1992): Cytochemical staining methods for electron microscopy.

12. Marton L (1968): Early history of the electron microscope. San Francisco. San Francisco Press, Inc. 1:1-8.

13. Palade G E (1952): A study of fixation for electron microscopy. J. Exptl. Med., 95:285-298,.

14. Peven D R, Gruhn J D (1985): The Development of Electron Microscopy. Arch. Pathol Lab. Med. July: 683-691,.

15. Sabatini D D, Bensch K, Barnett R J (1963): Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular structure and enzymic activity by aldehyde fixation. J Microsc. 92:69. "Alınmıştır." Glauert A M (1975): Fixation, Dehydration and Embedding of Biological Specimens. New York. American Elsevier Publishing Co., Inc..

16. Wagner, R.J (2000): Techniques in Biological Electron Microscopy Erisim: 28499 @ udel. Edu. Erişim Tarihi: 22.04.2002

17. Wall J S: Scanning Transmission Electron Microscop Erişim: Wall @ bnl.gov. Erişim Tarihi: 26.03.2002