FEN FAKÜLTESİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ

MBG255 HÜCRE BİYOLOJİSİ LABORATUVARI

Hazırlayan

Arş. Gör. Yusuf CEYLAN

Bartın, 2018

İÇİNDEKİLER

LABORATUVAR 1 GENEL KURALLAR, LABORATUVAR DEFTERİ VE RAPORLAR.....4

LABORATUVAR 2 HÜCRE İNCELEME YÖNTEMLERİ.....8

LABORATUVAR 3 KESİT ALMA VE HÜCRE BOYAMA 15

1. Boyama 15
   1.1. Bazik boyalar 15
2. Boyama Yöntemleri 18
   2.1. Basit Boyama 18
   2.2. Negatif Boyama.....18
   2.3. Bileşik Boyama 18
   2.4. Gram Boyama 19

MBG255 HÜCRE BİYOLOJİSİ LABORATUVARI

Dersin Sorumlusu: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz ERDEN (yerden@bartin.edu.tr)

Lab. Sorumlusu: Arş. Gör. Yusuf CEYLAN (ysf.cyln@gmail.com)

Laboratuvar Yeri: Moleküler Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı, Mehmet Akif Ersoy Derslikleri Binası, Zemin Kat

Değerlendirmeler

%25 rapor, %25 arasınav, %50 final (Bu üç değerlendirme parametresi ile öğrencinin dönem notu belirlenecektir)

Rapor puan değerlendirmesi ise;

Başlık;

Giriş; (Ders sorumlusunun istediği deneylerde)

Amaç;

Materyal method;

Bulgular;

Sonuç ve Tartışma;

Referans;

Sorularınız **sadece** yceylan@bartin.edu.tr ya da ysf.cyln@gmail.com mail adreslerinden cevaplanacaktır.

LABORATUVAR 1

GENEL KURALLAR, LABORATUVAR DEFTERİ VE RAPORLAR

Hücre biyolojisi laboratuvarları, mesleğiniz ile ilgili en temel bilgi ve teknikleri öğreneceğiniz önemli laboratuvarlardan bir tanesidir. Bir moleküler biyolog olarak, laboratuvarda yapılan çalışmaların hassasiyeti ve önemi bakımından laboratuvar öncesinde ve süresince bazı kurallara uyulması gerekmektedir. Aksi takdirde istenmeyen sonuçlarla karşı karşıya kalınması muhtemeldir.

Laboratuvar kuralları

- Laboratuvara gelmeden önce, yapılacak olan deney dikkatlice okunmalı, araştırılmalı ve bir çalışma planı yapılmalıdır. Bu, hem laboratuvarda yapılan deneyleri daha iyi kavramanızı hem de zamanın daha verimli kullanılmasını sağlayacaktır.
- Laboratuvara girmeden önce laboratuvar önlüğü giyilmelidir ve önü iliklenmelidir.
- Deney uygulaması laboratuvar sorumlusunun önerileri doğrultusunda yapılmalı, deney sırasınca oluşabilecek olağan üstü durumlar direk olarak sorumlulara iletilmelidir.
- Deneyin uygulanması süresince tüm dikkat ve ilgi çalışmaya yoğunlaştırılmalı, laboratuvardaki diğer çalışanların dikkatini dağıtıcı davranışlardan kaçınılmalıdır.
- Deneyde kullanılacak alet ve cam malzemelerin temiz olmasına dikkat edilmeli, kırık ve çatlak araç-gereçle çalışılmamalıdır. Çatlak ve kırık araç gereçler laboratuvar sorumlularına bildirilmelidir.
- Kimyasal madde ve çözeltilere elle dokunulmamalı ve asla tadına bakılmamalıdır.
- Bir maddenin kokusuna bakmak için, elle açık kaptaki buhar yelpazelenerek buhar buruna doğru gönderilir.
- Bir kaptan kimyasal malzeme alınacağı zaman kap üzerindeki etiket birkaç kez dikkatle kontrol edilmelidir. Etikette kullanılan malzemenin isminin doğruluğu tekrar kontrol edilmeli, son kullanım tarihi gözden geçirilmelidir.
- Kimyasal maddelerden kullanılacak miktardan fazlası alınmamalı, artan maddeler alındığı kaba geri konulmamalıdır.
- Herhangi bir yere asit veya başka bir aşındırıcı kimyasal döküldüğünde anında bol su ile yıkanmalıdır.
- Kuvvetli asitler lavaboya dökülmeden önce su açılmalıdır.
- İçinde reaktif veya ana kimyasal bulunan kapların ağzı kesinlikle açık bırakılmamalıdır.

- Deneyin bitiminde çalışma yeri ve malzemeler temizlenmelidir. Ayrıca not tutulan bench de temiz bırakılmalıdır.
- Laboratuvarda kesinlikle herhangi bir şey yenmemeli ve içilmemelidir.
- Herhangi bir laboratuvar kazası durumunda vakit geçirmeden laboratuvar sorumlusuna haber verilmelidir.

Laboratuvar Defteri

Bilimsel araştırmanın en önemli yanı, çalışmanızın kaydının tutulmasıdır. Bu nedenle iyi bir laboratuvar defteri önemli bir konudur. İyi bir laboratuvar defterinde, başka bir kişinin aynı deneyi tekrarlayıp aynı sonuçları alabileceği şekilde yeterli bilgi olmalıdır.

Bu laboratuvar kapsamında düzenli bir laboratuvar defteri tutmanız gerekecektir. Birbirine bağlı olmayan not kağıtları laboratuvar defteri yerine geçemez. Laboratuvar defterinizi her laboratuvarda mutlaka yanınızda getirmeniz gerekecektir. Laboratuvar süresince mutlaka her deneyin tarihi ve adı deftere yazılmalıdır. Ayrıca deney süresince kullanılan/yapılan her şey tek tek dikkatlice not edilmelidir. Solüsyonlar ve seyreltme serileri gibi hesaplamaların detayları mutlaka deftere not edilmelidir. Bütün fotoğraflar, figürler, çıktılar deftere yapıştırılmalıdır. Unutmayın, her gözlem önemlidir! Her dersin bitiminde defteriniz dersin sorumlusuna mutlaka paraflatılmalıdır.

Laboratuvar Raporu

Rapor, bilimsel yazıların ilk basamağıdır. İleriki yıllarda öncelikle bitirme tezi ve sonrasında projeler, makaleler yazmanız gerekecek, bu bağlamda rapor yazmayı öğrenmeniz ve alışkanlık haline getirmeniz ileriki zamanda size çok faydalı olacaktır.

Genel kurallar: Deneyleri grup halinde yapsanız dahi raporlar bireysel ve her kişiye özgü olmalıdır. Birbirinin kopyası halindeki raporlar öncelikli olarak tespit edilecek ve kimin kimden kopyaladığı sorgulanmaksızın aynı olan raporlar sıfır olarak değerlendirilecektir. Raporlarda dilbilgisi ve imla kurallarına dikkat edilmelidir: dilbilgisi ve imla hataları özensiz bir çalışmanın ilk göstergeleridir. Derse katılımınızın olduğu haftalar raporunuzu mutlaka dersin sorumlusuna paraflatınız. Katılmadığınız haftalar içim ise defterinizi daha sonra mutlaka tamamlayınız. Fakat rapor notlarınız hesaplanırken gelmediğiniz haftalar dikkate alınmayacaktır. Gelinen haftaların not toplamı, ders yapılan tüm haftaların sayısına bölünecektir.

Rapor formatı: Öncelikle şunu belirtmek gerekir ki, rapor resmi bir formdur. Dolayısıyla yazılan cümleler düzgün olmalıdır. İmla ve yazım hatası bulunmamalıdır. Gerekirse TDK sözlüğü ve imla kılavuzu kullanılmalıdır. Cümleler, yüklemi ve özneyi içeren tam cümleler olmalıdır. Rapor ne çok kısa, ne de gereksiz bilgiler içerecek kadar uzun olmalıdır. Sayfanın sağ-sol-alt-üst kısımlarından 3 cm boşluk olmalıdır. Öncelikle dersin adı ve kodu yazılmalıdır. Sonrasında ise raporu hazırlayan kişinin adı ve öğrenci numarası, grup numarası ve sonrasında konu ve amaç yazılmalıdır. Tür isimleri kurallara uygun yazılmalıdır.

1) Dersin kodu ve adı rapor kağıdına ortalanarak yazılır.

2) Konu o gün derste incelenecek konudur.

3) Amaç: Raporda deneyin amacı mutlaka belirtilmedir. Amaç şu şekilde yazılmalıdır: "Bu deneyin amacı ……..dır." veya "Bu deneyde ……. amaçlanmıştır." Amaç tek cümleyle anlatılmalıdır.

4) Materyal ve Yöntem*:* Deneyde kullanılan materyaller tek tek liste halinde yazılmalıdır. Deneyin yapılışı sırasında yapılan işlemler madde madde yazılmalıdır. Edilgen çatı kullanılmalıdır. Deneyin sonucu veya yorumuyla ilgili bilgi içermemelidir.

5) Bulgular: Sonuç kısmında sadece deneyde elde edilen sonuç belirtilmelidir. Elde edilen sonucun doğruluğu/yanlışlığı bu kısımda tartışılmamalıdır. Eğer sonuç mikroskobik bir gözlemse, ya laboratuvarda elde edilen fotoğraf ya da gördüğünüz şeklin çizimi yer almalıdır. "Deney sonucunda boya eklenmesi sonucu çözeltinin renginin sarıya dönüştüğü gözlemlendi", "Deney sonucunda yukarıdaki fotoğrafta görülen hücreler gözlemlendi", vs. Çizilen şekil altına şekil yazısı ve büyütme yazılmalıdır.

6) Sonuç ve Tartışma: Yorum kısmında öncelikle amaçla sonucun karşılaştırması yapılmalı, beklenen sonuca ulaşılıp ulaşılmadığı belirtilerek eğer ulaşılmadıysa bunun neden kaynaklanmış olabileceği tartışılmalıdır. Eğer sonuçta bir gözlem yapıldıysa bu gözleme ait tartışmalar ve yorumlar bu kısımda yapılmalıdır: "Eklenen boya nişasta olan ortamı sarıya çevirme özelliği taşımaktadır. Deney sonucunda çözeltinin sarıya döndüğü gözlemlendiği için çözeltinin nişasta içerdiği söylenebilir." , "Deney sonucunda elde edilen görüntüde metilen mavisi ile boyanan preparatların nükleusu daha belirgin olmuştur. Bunun nedeni metilen mavisinin nükleusları boyamasıdır.", "Bitki hücreleri kloroplast içerirken, bu deneyde

gözlemlenen epitel hücrelerinin kloroplast içermediği görüldü.” Bunların haricinde, deneyde kullanılan çözeltilerin, boyaların neden kulla

nıldığı, deneyde yapılan önemli işlem basamaklarının neden yapıldığı yorum kısmında açıklanmalıdır.

Referans: Özellikle teori ve yorum kısmında kullanılan bilgiler herhangi bir kaynak kullanılarak yazıldıysa (ki teorik bilgi mutlaka en az bir kaynak kullanılarak yazılmalıdır) bu kaynaklar açık ve net bir şekilde belirtilmelidir. Referans olarak internet sitesi kullanıldıysa sitenin tam adı yazılmalıdır. Eğer bir kitap referans olarak kullanıldıysa kitabın tam adı, yazarı/yazarları, basım yılı ve verdiğiniz bilginin hangi sayfada olduğu belirtilmelidir. “Campbell biyoloji kitabı 511.sayfa” doğru bir referans değildir. Giriş ve yorum kısmında internetten alınan şekil varsa, bu şekillerin alındığı referanslar mutlaka belirtilmelidir.

Örnek:

Makaleden alınan referans için;

Ceylan Y, Özdemir FA, Bülbül AS (2017). Effects of Different BAP and NAA Concentrations on Micropropagation of Crambe orientalis L. var orientalis L. Journal of Animal and Plant Ssciences, 27:5, 1671-1677.

Bildiri referansı için;

Ceylan KB, Ceylan Y, Can HT, Çelik Altunoğlu Y, Baloğlu MC. (2018). Determination and Bioinformatics Analysis of ZjuHsp90 Genes in Jujube. International Symposium Ecology 2018. Kastamonu – TURKEY.

Kitap bölümü referansı için;

“Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler” İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM) Yayın No:3, Editörler: Güler TEMİZKAN & Nazlı ARDA, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008, ISBN: 978-975-420-583-1, Sf:55-56.

LABORATUVAR 2

HÜCRE İNCELEME YÖNTEMLERİ

Canlılar hücre adı verilen küçük ve aktif yapılardan meydana gelmektedirler. İnsanlar, hayvanlar, bitkiler gibi canlılar çok hücreden oluştukları halde doğada bakteriler, mayalar, protistler ve bazı algler gibi birçok organizma tek hücreden meydana gelmektedir. Hücreler çok küçük ve oldukça karmaşık yapılardır. Özellikle çok hücreli organizmalar farklı görevleri yerine getirebilmek için birbirinden farklı yapıda olmaları sebebiyle hücrenin yapısını ve moleküler kompozisyonlarını incelemek ve bileşenlerini anlamak çok zordur. Hücre inceleme tekniklerini iki başlık altında toplayabiliriz.

A. Hücreyi bir bütün olarak inceleyen teknikler
B. Hücre bileşenlerinin analizi için kullanılan teknikler

A. Hücreyi bir bütün olarak inceleyen teknikler

Farklı yapıdaki hücreleri ve hücrenin farklı kısımlarının özelliklerini inceleyen üç farklı teknik vardır.

i. Tesbit (fiksasyon) ile inceleme
ii. Canlı (vital) inceleme
iii. Hücre kültürleri

A1. Tesbit (fiksasyon) ile inceleme

Hücrelerin farklı bölgelerinin ışığı kırma katsayıları birbirine yakın olduğundan hücrenin ayrıntılarının daha iyi gözlenebilmesi için hücrenin tesbit (fikse) edilmesi ve değişik boyalarla boyanması gerekir.

Tespitin (fiksasyonun) amacı:

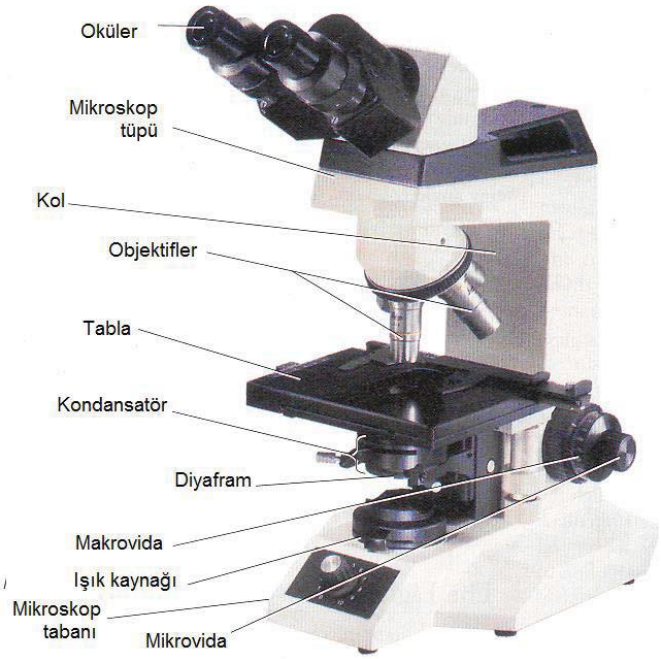
1. Hücre ve dokuların canlı hale en yakın biçimde muhafaza etmek,
2. Otolizi, bakteriyel bozuma ve çürümeyi önlemek,
3. Kolaylıkla diffüzyon olan maddelerin kaybını önlemek,
4. Sağlığa zararlı kötü etkilere karşı dokuyu kuvvetlendirmek ve
5. Dokunun boyalarla ve diğer reaktiflerle boyanmasını kolaylaştırmak.

Işık mikroskobu; Görünür dalga boyundaki ışıkla aydınlatılmış cisimlerin büyütülerek incelenmesinde kullanılır. Işık mikroskopları **optik** (Kondansatör, oküler, objektif) ve **mekanik** (ayak, kol, makro-mikro vida) olmak üzere iki kısımdan meydana gelir.

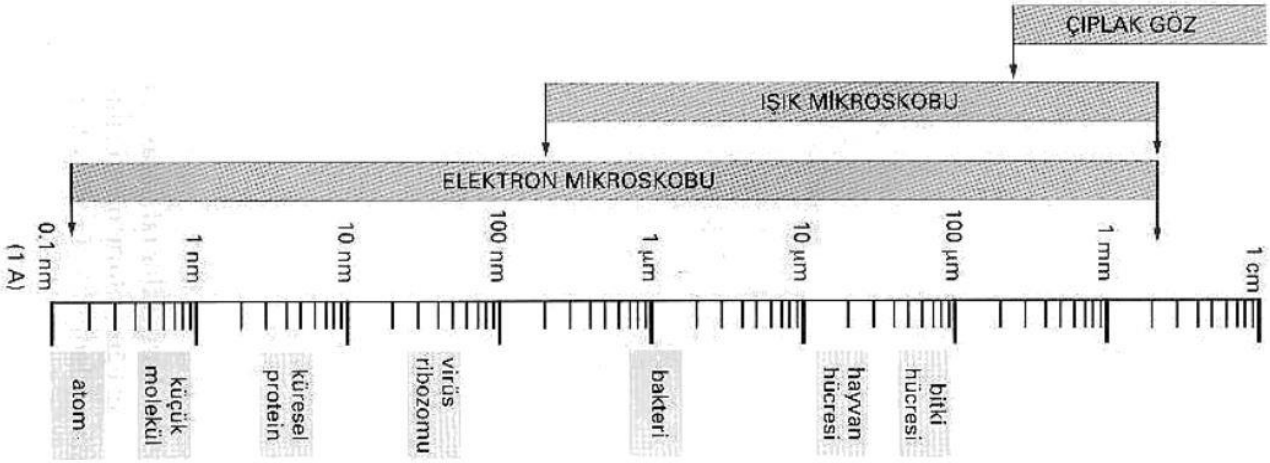
Lambadan yansıyan ışık, kondansatör yardımıyla 8lectron8on bulunduğu mikroskop tablasında toplanır ve preperat aydınlık alanda incelenir. Canlı hücreler homojen bir yapıya sahip oldukları için, ışık

hücrenin çeşitli bölgelerinden farklı fazlarda geçemez. Bu nedenle ışık mikroskobu çalışmaları için cisimler uygun boyalarla boyanıp yapılarına bir farklılık kazandırıldıktan 9lect incelenirler.

Boyama öncesinde, örneklerin korunması için genellikle tesbit (fiksatif) çözeltiler (alkol, asetik asit veya formaldehit) kullanılır.



Şekil 2.1: Işık mikroskobu



Şekil 2.2: Çıplak göz, ışık mikroskobu ve 9lectron mikroskobu ile görülebilen boyut cetveli

Steromikroskop; Büyük ve opak materyalleri inceleyerek diseksiyon (ayırarak inceleme) imkanı veren, iki gözle bakılarak üç boyutlu görüntü sağlayan mikroskoplardır. Bu mikroskoplarda büyütme genellikle x4 ve x40 arasında değişir, x4 ve x40 objektifleri bulunmaktadır.

Şekil 2.3: Steromikroskop

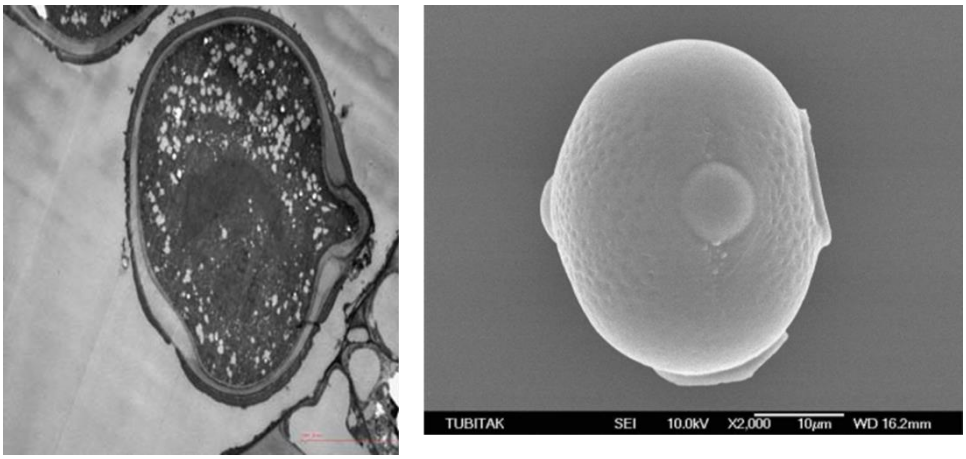
Fluoresan (Floresan) mikroskobu; Floresans maddelerin ışığı emme prensibine dayanır. Bir cisim mor ötesi ışıkla (UV) aydınlatılırsa, cisim de onu absorblayarak görünür bir ışık enerjisi (mavi, mor, yeşil, sarı, turuncu, kırmızı) saçarsa o madde doğal floresanstır. Floresans veren bazı boya ya da kimyasal maddelerin biyolojik materyale uygulanması ile sekonder (yapay) floresans oluşturulabilir. Bu mikroskobun ayırma gücü, kullanılan ışığın dalga boyu küçük olduğundan ışık mikroskobunun ayırma gücünden daha yüksektir.

Polarizasyon mikroskobu; Işığın polarizasyonu yani kutuplanmasından yararlanarak yapılan mikroskoptur. Işığı çift kırma yani anizotropi özelliği gösteren yapıların (kas lifleri, silya, kollajen lifleri vb.) incelenmesinde kullanılır. Polarizasyon mikroskobu taze ve tespit edilememiş cisimlerin araştırılmasında, molekül yönlenmelerinin belirlenmesinde, hücresel yapıların kimyasal bileşimleri, sitoplazma, kromozomlar, iğ iplikleri, kas telleri, sinir lifleri gibi hücresel yapıları, tırnak boynuz ve kemik kesitlerini, kristalize hormonları ve vitaminleri incelemede ve özellikle mineralojide mineral yapıların araştırılmasında kullanılmaktadır.

İnterferans mikroskobu; Değişik bölgelerin farklı yoğunlukları sayesinde kırılma indisleri ile farklılıkları ortaya koyar ve renkli bir görüntü oluşumunu sağlar.

Transmisyon (geçişli) elektron mikroskobu (TEM); Elektron mikroskobunda kullanılan elektronların dalga boyları görünür ışığın dalga boyundan yaklaşık 100.000 kat daha kısadır. Işık mikroskobunda kaynak ışık ışınlarıdır ve mercek sistemi camdan yapılmıştır. TEM'de ise kaynak elektron ışıkları yayan bir metal flaman, mercekler ise manyetik sistemlerdir. TEM'de objeden geçen 10lectron akımı ile görüntü sağlanır. Örnekteki yoğun bölgeler daha fazla elektron saçtığından daha koyu görünürler. Uranil asetat, osmiyum tetroksit, kurşun sitrat gibi ağır metallerin tuzları elektron boyası olarak kullanılır.

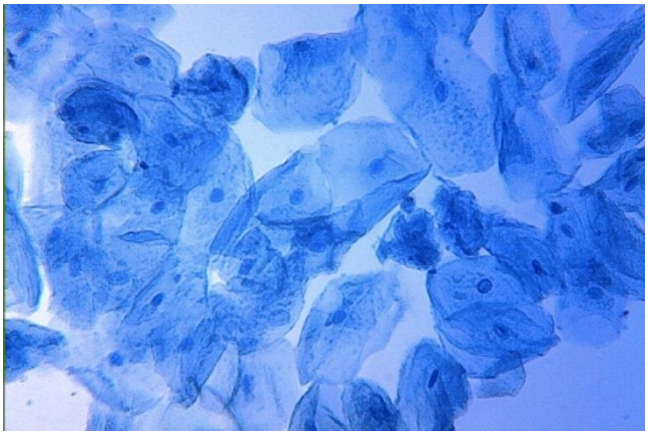
Scanning (taramalı) elektron mikroskobu (SEM); Görüntü cismin içinden geçen elektronlarla değil, cismin yüzeyinden verilen elektronlardan oluşur. Cisim ince bir altın film ile kaplanır. Objenin yüzeyindeki değişimler, örnekten yayılan elektronların olduğu yerde motif gibi görünür. Bu motifte delikler ve yarıklar karanlık, tepecikler ise açık renkli görünür.



Şekil 2.4: *Lathyrus undulatus* bitkisine ait polenlerin TEM ve SEM'de görünüşleri

A2. Vital (Canlı) İnceleme

İncelenecek olan hücrelerin canlı kalmasına izin veren solüsyonlar ile çalışılarak, objenin canlı kalmasına özen gösterilir. Canlılığın kısa süre devamını sağlamada pH değerlerini istenilen noktada tutan "fizyolojik su" gibi ortamlar yardımcıdırlar. Yani hücre bulundukları ortamda veya bulundukları ortama çok yakın belirli iyon konsantrasyonları içeren ortamlarda incelenir (örneğin; bir hücreliler, sperm hücreleri). Bu incelemede eğer boyama yapılacak ise belli ksımlar belirgin hale getirilir. Boya solüsyonlarının da bu özellikte olmaları tercih edilir. Canlı halde konsantrastlık farklılıkları ancak özel mikroskoplarla ortaya çıkacağından, genel belirlemede doğal renklendiricilerle "vital boyama" yapılmaktadır. Hücrelere zarar vermeyen boyalar ile yapılan bu boyamada her boya belirli yapıları boyadığı için görülmek istenen yapı özelliğine uygun boyalar seçilir (örneğin; nötr kırmızı vakuolleri boyamada kullanılır).



Şekil 2.5: Metilen mavisi ile boyanmış ağız içi epitel hücre çekirdekleri.

A3. Hücre Kültürleri

In vitro (laboratuvar ortamı, yapay koşul) ortamda hücreleri büyütüp geliştirmek için *in vivo* (canlıda) şartların taklit edilmesi gerekmektedir. Bu tekniğin temeli değişik dokulardan özellikle embryonik dokulardan alınan hücrelerin belirli ortamlarda saklanması ve bu ortamlar içinde büyüme yeteneği kazanmalarına dayanmaktadır. Bu ortamlarda genellikle kompleks karbonhidrat karışımları, amino asitler, tuzlar, vitaminler, hormonlar ve çeşitli büyüme faktörleri bulunur. In vitro ortamlardan elde edilen hücrelerde, hücrenin bir bütün olarak incelenmesinde bir araçtır.

B. Hücre Bileşenlerinin Analizi için Kullanılan Teknikler

Proteinler, yağlar, nükleik asitler vb. hücre bileşenlerinin incelenmesinde çeşitli kimyasal teknikler kullanılmaktadır. Bu kimyasal tekniklerin yanında daha da kapsamlı çalışmalar yapabilmek için hücreyi kısımlarına parçalayarak teknikleri kullamılmaktadır.

B1. Homojenizasyon

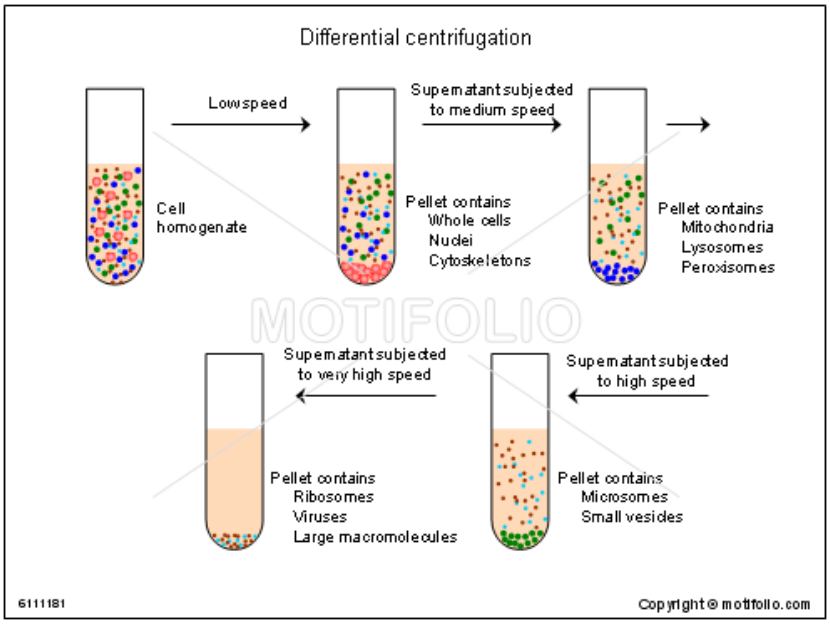
Farklı mekanik ve kimyasal yollarla hücrelerin sınırları parçalanır ve homojenize edilir. Homojenizasyon olayı tampon çözeltisi içinde yapılır. Kullandığımız tampon çözeltisinin pH'ı ve içerikleri homojenizasyonda çok önemlidir. Elde edilmek istenen makromoleküle özel tampon seçilmelidir. Homojenizasyon yapılan hücre veya hücreler santrifüj yöntemiyle kısımlarına ayrılır.

B2. Santrifüj Yöntemleri

Bu teknikte santrifüj adı verilen aletler yardımıyla, örnekler yüksek hızda döndürülerek merkezkaç kuvveti oluşturulan bir alanda partiküllerin davranışı temeline dayanır. Farklı büyüklük ve yoğunluktaki çeşitli organel veya partiküller, farklı çökelme hızlarına göre ayrı ayrı elde edilebilirler. Bu nedenle homojenize edilen hücreler önce **Ayırıcı (Differential-velocity) santrifüjleme** sonrada ya kütlelerine göre **Rate-zonal santrifüjleme** ve ya partikülleri yoğunluklarına göre ayıran **Equilibrium density gradient santrifüjlemeye** tabi tutulur.

B2.1. Ayırıcı (Differential-velocity) santrifüjleme

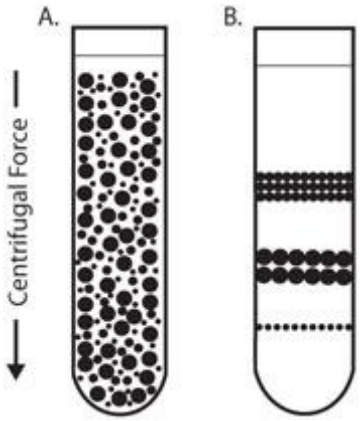
Kısımlarına ayrılması istenen homojenat gittikçe artan santrifüj kuvvetine maruz bırakılır ve her aşamada santrifüj kuvveti ve süresi belirli bir kısmının çökmesi için ayarlanır. Her aşamadan sonra pellet (dipte çöken tortu) alınıp özel inceleme için ayrılırken süpernatant (üstte kalan faz) tekrar daha yüksek hızda santrifüj edilir. Böylece homojenat içindeki tüm kısımlar ayrı ayrı elde edilir. Çok farklı kütle ve yoğunluğa sahip organel ve ya partiküller birbirinden ayrılırken yakın kütle ve yoğunluğa sahip organel ve ya partiküller birbirinden ayrılamazlar.



Şekil 2.6: Ayırıcı santrifüjleme

B2.2. Rate-Zonal Santrifüjleme

Daha önce elde edilen fraksiyonlar içinde özel bir solusyon bulunan santrifüj tüpüne ilave edilir. Tüpe eklenen homjenat santrifüj edilince partiküller santrifüj gücü, partikülün kütlesi, partikül ve ortamın yoğunluk farkı partikül ve ortamın sürtünmesi tarafından kontrol edilir. Santrifüj tamamlandığında farklı büyüklükteki moleküller tüp içerisinde farklı bölgelerde yer alırlar.

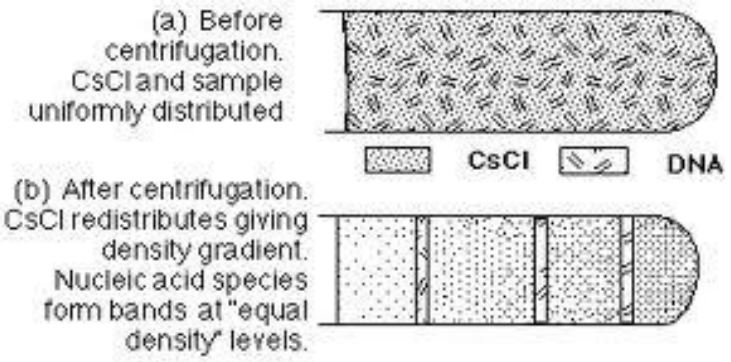


Şekil 2.7: Rate-zonal santrifüjleme yapılmuış bir örneğin görüntüsü

B2.3. Equilibrium Density Gradient Santrifüjleme

Rate zonal santrifüjlemeye benzer. Bu yöntemde en yaygın kullanılan solüsyon sezyum kloriddir. (cesium chloride=CsCl) Sezyum (Cs^+) iyonları çok yoğun oldukları için ultrasantrifüjleme de bir güç alanı oluşturarak çökerler. Bu yüzden tüpün dibinde daha fazla Cs^+ olmak üzere bir gradient oluşur. Bu

esnada yükü nötralize etmek için Cl^- iyonları da tüpün dibinde daha fazla bulunur. Farklı yoğunluktaki türlerin nükleik asitlerini saflaştırmak için kullanılır.



Şekil 2.8: Equilibrium Density Gradient yöntemi ile santrifüjleme

Referanslar:

Abant Izzet Baysal University Cell Biology Schedule 2013.
ARIKOĞLU Hilal, KAYA Dudu Erkoç, KÖKSOY Hale, IŞIK Aycan, BOZKURT Sevgi, ZEYBEK Seyran, AVCI Ebru, GÖKTÜRK Fatma, ÖZCAN Simge ve DENİZ Havva (2015). *Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Biyoloji Laboratuvar Kılavuzu*, Konya.
ÜNAL Meral, VARDAR Filiz ve İSMAİLOĞLU Işıl (2014). *Hücre Biyolojisi Laboratuvarı, Güncellenmiş 3. Basım*. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara.

LABORATUVAR 3

KESİT ALMA VE HÜCRE BOYAMA

Histoloji, sitoloji ve patoloji çalışmalarında çeşitli organ ya da dokulardan kesit alınarak örnekler sitolojik ya da histo-patolojik yönden değerlendirilir. Hücre ve dokuların canlı halde uzun süre veya saydam olarak incelenmesi sınırlı olduğundan; çoğunlukla incelenecek olan doku parçası organizmadan çıkarılır, fikse edilir ve hazırlanan prepatlar halinde mikroskopda gözlem yapılır.

Laboratuvar koşullarında dokudan kesit alma işlemi bisturi ve jilet gibi materyaller yardımı ile yapıldığı gibi kesit bu amaçla mikrotom cihazı da kullanılmaktadır. Mikrotom ile 5-7 µm lik kesitler alınır.

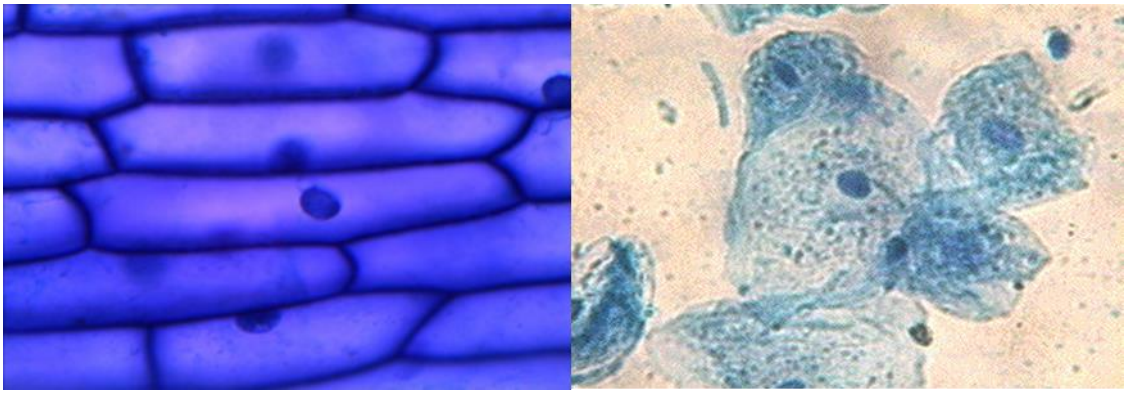
1. Boyama

Boyama, kimyasal bir olaydır. Boyalar genellikle tuz yapısındadırlar. pH'larına göre *asidik, bazik, nötral* olabilirler. Mikroskopta kolay görmeyi sağladıkları gibi, incelenen materyalin büyüklük, şekil, spor, kapsül, internal sütrüktürleri hakkında da bilgil sahibi olunmasını sağlayabilirler. Boyanma özelliklerine göre de bazı mikroorganizmalar identifiye edilebilirler.

1.1. Bazik boyalar

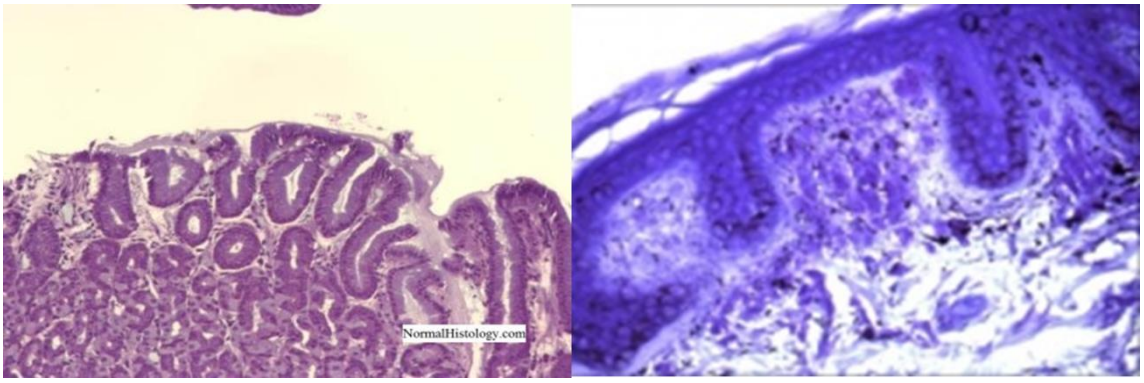
İyonize oldukları zaman, molekülün boya kısmı pozitif elektrikle yüklenir. Bunlar da renkli bazların tuzlarıdır (genellikle, klorid benzen sulfat, okzalat ve asetat). Bazik boyalardan, metilen mavisi (methylene blue), crystal violet, carbol fuchsin, safranin, malachite green çok kullanılır.

Metilen mavisi (Methylene blue); Löffler metilen mavisi solusyonu kullanılır. Preparat üzerine boya solusyonu konarak 5-8 dakika bekletilir. Boya dökülür, yıkanır, kurutulur ve görüntü edilir. Mikroskopta görüntü, mavi renkte görülürler. Önemli bir bateri boyama boyasıdır. Hücrelerin genellikle çekirdeklerini boyar.



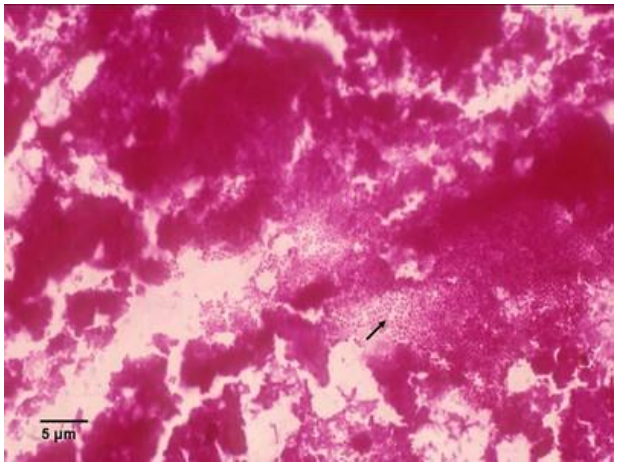
Şekil 3.1: Metilen blue ile boyanmış örnekler

Kristal viyole (Crystal violet); Hazırlanan preparat üzerine boya solusyonundan (kristal violet) konarak 20-30 saniye kadar bekletilir. Sürenin sonunda boya dökülür, preparat su ile yıkanır, kurutulur ve görüntü elde edilir. Preperatlar mor renkte görülürler. Kristal viyolenin kullanılacağı zaman hazılanması uygundur. Çekirdek, mitokondri ve plastitleri iyi bir şekilde boyar.



Şekil 3.2: Kristal viyole ile boyanmış örnekler

Karbol fuksin; Kurutulmuş ve fikse edilmiş preparatlar üzerine, karbol füchsin solusyonu, filtre kağıdından süzülerek konur ve 5-10 saniye boyama için bırakıldıktan sonra, boya dökülür ve hafif akan su ile yıkanır. Kurutma kağıdı ile (veya havada) kurutulduktan sonra, üzerine sedir yağı konularak görüntü elde edilir. Preperatlar kırmızı renkte görülürler. Çoğunlukla bakteriyel boyama yöntemlerinde kullanılmaktadır.

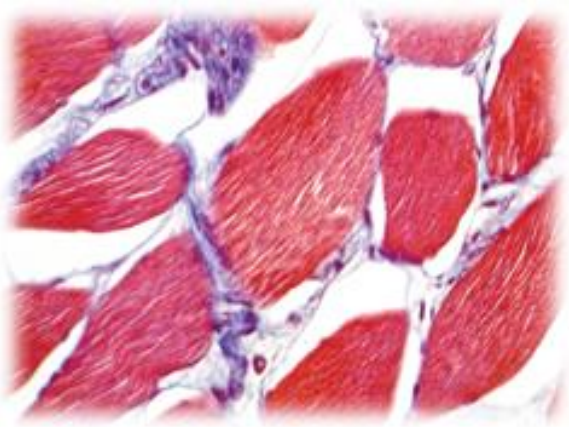


Şekil 3.3: Karbol fuksin ile boyanmış örnek

1.2. Asidik boyalar

İyonize oldukları zaman, molekülün bir kısmı negatif elektrikle yüklenir. Bunlar da renkli asitlerin tuzlarıdır (genellikle, sodyum tuzu). Bazen potasyum, kalsiyum veya amonyum tuzları olabilir. Asit boyalar arasında, asit fuchsin, asit pikrik, eosin, v.s bulunmaktadır.

Asit fuksin; Genellikle kasları kollajenlerden ayırarak dokuların sitoplazma ve çekirdeklerini boyamak için kullanılır. Kaslar kırmızı renkte, kollajenler ise mavi ya da yeşil görülür.



Şekil 3.4: Asit fuksin ile boyanmış örnek

1.3. Nötral boyalar

Nötr boyalar iyonik olmayan boyalardır. Bunlar suda çözünen renkli organik bileşiklerdir. Burada nötr tuzu meydana getiren asid ve bazın her ikiside renklidir. Hematoloji ve mikrobiyolojide sık kullanılan bu boyalara Giemsa boyası en güzel örnektir. Giemsa daha çok parazitolojik inceleme amacıyla kullanılır.

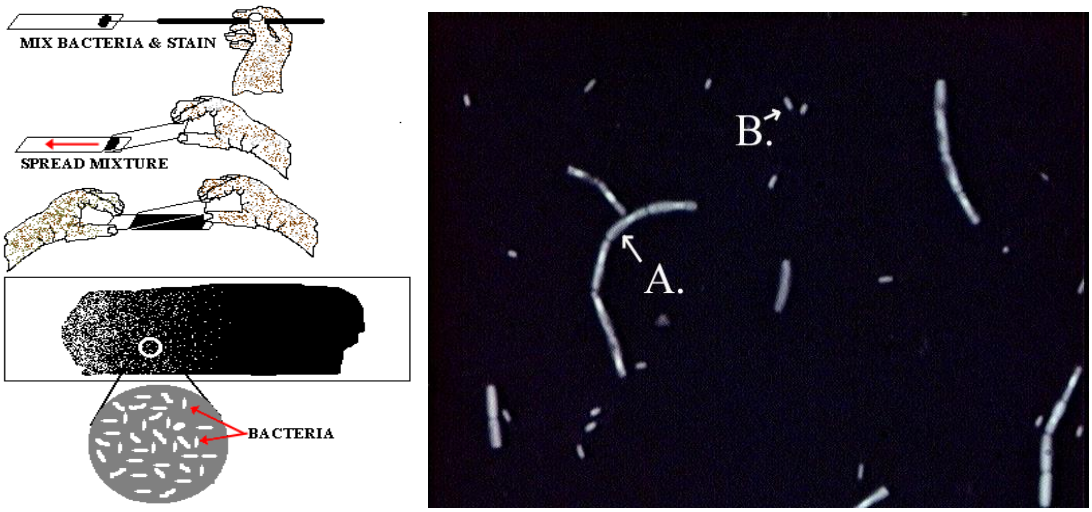
2. Boyama Yöntemleri

2.1. Basit Boyama

Bu tarz boyamada, preparatlar hakkında kısa süre içinde bilgi edinmek için tek boya solusyonu kullanılır (büyüklük, şekil, düzen vb.). Boya, preparata bir defa uygulanır. Karbol füchsin, kristal violet ve metilen mavisi gibi genellikle bazik boya solusyonlarından birisi seçilir.

2.2. Negatif Boyama

Bu tür boyama yönteminde örneğimiz değil, saha boyanır. Genellikle asidik boyalar tercih edilir. Karanlık olan sahada örnek renksiz veya parlak olarak görülürler. Bu amaç için nigrosin veya çin mürekkebi kullanılır. Lam üzerine bir damla boya ve sonra bir damla kültür konarak yayılır. Kuruduktan sonra muayene edilir. Bu yöntemden kapsül ya da spor görmek için yararlanılır.



a b

Şekil 3.5: (a) negatif boyama tekniği, (b) negatif boyama ile boyanmış bir bakteri (A) ve bakteri endosporu (B)

2.3. Bileşik Boyama

Birden fazla boyanın kullanılması ile yapılan boyama yöntemleridir.

2.3.1. Diferensiyel boyamalar: Mikroorganizmaları birbirinden ayırmada kullanılır (Gram, Ziehl Neelsen).

2.3.2. Sütrüktürel boyamalar: Bakterilerin iç ve dış yapıları hakkında bilgi edinmek için kullanılan bileşik boyama yöntemleridir (spor, kapsül, flagella, çekirdek, lipid, v.s.).

2.4. Gram Boyama

Gram boyama, bakterileri hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre iki büyük gruba (Gram-pozitif, Gram-negatif) ayırmak için kullanılan bir yöntemdir.

Gram Boyamasında Etkili Olan Mekanizmalar

Mikroorganizmaların gram boyamasında, bakteri kültürünün yaşı ve bakteri hücre yapısı ile ilgili mekanizmalar etkilidir. Genel olarak yaşlanmış kültürden elde edilen preparat gramla negatif boyanma eğilimindedir. Bundan dolayı incelenecek kültürün yeni olması (24 saatlik) önemlidir.

Gram (+) ve gram (-) bakteriler hücre yapıları açısından birçok farklılık göstermektedir:

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında gram negatiflere kıyasla oldukça kalın peptidoglikan tabaka mevcuttur. Bu nedenle, aldıkları boyayı alkolle dekolarizasyonda gram negatiflere nazaran daha geç bırakırlar.

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında karbonhidratlar, gram negatiflerde lipidler fazladır. Karbonhidratlar alkolle dekolarizasyon esnasında dehidratasyona (su molekülü açığa çıkar) uğrar. Porlar iyice büzüşür, daralır ve boya dışarı çıkamaz. Lipitler için ise alkol çözücüdür ve hücre çeperinde olan porlar daha çok açılacaktır.

Gram pozitif hücre duvarında bulunan teikoik asit, bazik boyalarla daha kuvvetli birleşik oluşmasını sağlar.

Bakteri protoplazmasının pH‘ı da önemlidir. Gram pozitiflerdeki protoplazmanın pH‘ı daha asidiktir.

Referanslar:

BACSO Zsolt, NAGY Peter, VARGA Tamas ve VEREB György (2003). *University of Debrecen, Medical and Health Science Center Cell Biology Laboratory Manual.*

ÇOTUK, A. (2003). Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

GÜVEN, S., ZORBA, N. N. D. (2013). *Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.

KARAHAN, A. G., ARIDOĞAN, B. C. ÇAKMAKÇI, M. L. (2002). *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

MADİGAN, M. T., MARTİNKO, J. M. (2005). *Brock Biology of Microorganisms,* 11th Edition. Publisher: Pearson Prentice Hall. United States

ÜNAL Meral, VARDAR Filiz ve İSMAİLOĞLU Işıl (2014). *Hücre Biyolojisi Laboratuvarı, Güncellenmiş 3. Basım*. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara.