

Specimen preparation for transmission electron microscopy – Transmisyon elektron mikroskopide doku takibi

Melek Kucukoglu

Department of Pathology, Çukurova University, Faculty of Medicine, Adana, Turkey

Accepted for publication on 10 December 2004

Virtually every step of the procedure affects the quality of the final electron micrographs in preparing specimens for transmission electron microscopy. Therefore, it is important to process tissues according to the prescribed methods and to understand what is happening to the sample during processing. Specimen processing should begin with careful planning and proceed with meticulous attention to the details. Since tissue processing represents considerable effort, it is better to execute it properly the first time, rather than to repeat the entire procedure.

Tissue preparation for transmission electron microscopy may be divided into eight major steps: primary fixation (2-4 % glutaraldehyde in buffer), washing in buffer, secondary fixation (1-2 % osmium tetroxide in buffer), dehydration (30-100% ethanol), infiltration with transitional solvents (propylene oxide), infiltration with resin (propylene oxide:resin mixtures; gradually increasing concentration of resin), embedding (pure resin mixture), and curing at 60°C.

The process begins with living hydrated tissue and ends with tissue that is virtually water-free and preserved in a static state within a plastic resin matrix. The plastic resin mixture permeates the tissue, replacing all water within the cell and making the cell firm enough for the section to be cut.

Elektron mikroskopi için doku takibe alınmadan önce yapılması gereken işlemler ve dikkat edilecek noktalar

1. Doku 2 mm³'den büyük olmamalı.
2. Doku alındıktan hemen sonra soğuk (+4°C) glutaraldehit veya karnosky fiksatifine konulmalı. Fiksasyon volümü doku volümünün en az 10 katı olmalıdır.
3. Doku fiksatifte alındıktan sonra en kısa zamanda elektron mikroskopi laboratuvarına ulaştırılmalı.
4. Biyopsinin yapıldığı saat ve tespit solüsyonuna konulduğu saat not edilmeli.
5. Gelen dokunun fiksatif kirlenmiş ve kanlı ise hemen taze ve soğuk fiksatifle değiştirilmeli.
6. Eğer doku fiksatif içinde 2 mm³'ten büyük gönderilmiş ise dişçi balmumu üzerinde temiz bir jilet veya bistüri ile küçültülmeli.

7. Doku parçaları +4°C'de muhafaza edilmeli.
8. Protokol defteri tutulmalı.
 - a. Dokunun geliş tarihi
 - b. Dokunun protokol nosu
 - c. Dokunun adı ve açıklayıcı bilgi
 - d. Dokunun geldiği servis adı veya araştırmacı adı
 - e. Dokunun alındığı yer
 - f. Dokuyu alan doktor veya araştırmacının adı
 - g. Doku takibini yapan teknisyenin adı

Kan, kemikiliği ve diğer hücre süspansiyonları mutlaka santrifüj edilerek işleme alınır. Kemikiliği ve kan heparinize enjektöre alınmalıdır. Ardından santrifüj edilir. Üzerinde kalan plazma pipetle alınır ve atılır. Üzerine taze ve soğuk fiksatif eklenir. Tüpün tabanında kalan örnek kalınlığı 0.5 mm'den daha kalın olmamalıdır. Örnek fazla ise bir kaç tüpe

paylaştırılarak tüpün tabanında ince bir tabaka kalması sağlanmalıdır. Fiksatif en az iki kez tazelenmelidir. Fiksatif veya buffer ilaveleri sırasında dağılan hücre tabakası santrifüj edilerek yeniden çöktürülür. Fiksasyon süresi tamamlandıktan sonra diğer dokular gibi takibe alınır. Osmikasyon ve dehidratasyon işlemlerinden sonra doku plakalar halinde sertleşir rengi siyahlaşır. Bloklama öncesi resinde bekletileceği aşamada bir iğne ile tüpün tabanından oynatılarak doku plakalarının küçük parçalar halinde dağılması sağlanmalıdır. Bu işlem dokuya rezinin infiltrasyonunun daha iyi olmasını sağlar.

Doku takibi

Dişçi balmumu üzerinde 1-2 mm³'lük parçalar halinde kesilen dokular ezilmemeleri için özenle küçük cam şişelere alınır, üzerine protokol numaraları yazılır. Soğuk fiksatif ilave edilir. Dokunun elektron mikroskopi laboratuvarında parçalanıp doku tespit solüsyonu ile temas ettiği saatte doku takip işlemi başlamış olur. Tüm solüsyonlar ve dokular buzdolabında tutulmalıdır. Sadece solüsyon değiştirme zamanlarında çeker ocak altında çalışılır, dokular tüm bekleme aralıklarında tekrar buzdolabına konulmalıdır.

I. GÜN

1. Glutaldehyde veya Karnovsky solüsyonu - 4 saat +4°C (primer fiksasyon)
2. Buffer ile yıkama - 10 dakika + 4°C
3. Buffer ile yıkama - 10 dakika + 4°C (genellikle 1 gece)

II. GÜN

1. Osmium tetroxide solüsyonu - 2 saat +4°C (sekonder fiksasyon)
2. Buffer ile yıkama - 10 dakika +4°C
3. Buffer ile yıkama - 10 dakika +4°C (bir veya birkaç gece)
4. Dehidratasyon aşaması
 - % 50'lik etil alkol - 15 dakika +4°C
 - % 70'lik etil alkol - 15 dakika +4°C
 - % 86'lık etil alkol - 15 dakika +4°C
 - % 96'lık etil alkol - 15 dakika +4°C
 - % 100'lük absolute alkol - 15 dakika +4°C
 - % 100'lük absolute alkol - 15 dakika +4°C

Bu aşamaya kadar olan işlemlerin tümü +4°C'de buzdolabında yapılır.

5. % 100'lük absolute alkol - 15 dakika oda sıcaklığı
6. Propylene oxide - 15 dakika
7. Propylene oxide - 15 dakika
8. Propylene oxide + resin - 30 dakika.
9. Propylene oxide + resin - 30 dakika.
10. Resin solüsyonu - 1 gece rotorda döndürülür.

Yıkama işlemi, fiksatifin hazırlandığı buffer ile yapılmalıdır. Solüsyon değiştirme sırasında doku parçalarının kurumaması önlenmeli ve bir çeker ocak altında çalışılmalıdır. Eldiven kullanımı, koruyucu gözlük veya çeker ocağın koruyucu cam bölmesinin indirilmesi çalışanı toksik maddelerden koruyacak önlemlerdir.

III. GÜN

Taze rezin solüsyonu hazırlanır. Rotordan alınan doku şişeleri tek tek içinde bulun-dukları rezinden arındırılır. Bunun için rezinin fazlası bir şişeye boşaltılır (bu rezin atık olup sertleştikten sonra çöpe atılmalı veya daha da iyisi biriktirildikten sonra uygun bir kuruluşla imha edilmek üzere teslim edilmeli), dokunun bulunduğu kısım temiz bir kağıt üzerine boşaltılır, ince uçlu bir alet ile dokular birer birer ezmeden bir kenara alınır. Daha sonra uygun plastik blok kapsüllerinin konik tabanına yerleştirilir. Kapsüller taze rezin ile doldurur. Bir süre hava kabarcıklarının uzaklaşması için beklenir veya kapaklı kapsüller ise; santrifüj edilerek hava kabarcıkları uzaklaştırılır. Özel plastik blok kapsülleri uygun plastik pleytlerde +60°C'de 48 saat bekletilir. Bu sürede rezin polimerize olarak sertleşir. 48 saat sonra bloklar etüvden çıkarılır, soğumaya bırakılır. Böylece doku ultramikrotomda kesit alınabilecek duruma gelmiş olur. Burada blokların numaralandırılması önemlidir. Numaralandırma küçük kağıtlara yapılıp rezin henüz sıvı haldeyken blok içine yerleştirilerek veya polimerizasyondan sonra blok üzerine kazınarak yapılabilir.

Hazırlanan rezinin artan kısmı dökülmemeli, bir sonraki çalışmada propylene oxide ile karışım aşamasında kullanılmak üzere ağzı iyi bir şekilde kapatılarak saklanmalıdır. En fazla bir hafta kadar saklanabilir.

Elektron mikroskopide kullanılan fiksatif (tespit) ve buffer (tampon) solüsyonlarının hazırlanması

Değişik buffer solüsyonlarının ve fiksatiflerin tonisitesi, PH'sı ve konsantrasyonu zaman zaman araştırmacılar tarafından modifiye edilmiştir.

Burada en çok kullanılan buffer ve fiksatiflerin formüllerini vermekle yetineceğiz.

Solüsyonların hazırlanmasında tartım ve ölçümlerin oldukça dikkatli yapılması, temizlenmiş ölçüm kaplarının ve muhafaza şişelerinin kullanılması, laboratuvar çalışma disiplinine uyulması hazırlanan fiksatiflerin etkili olabilmesi yönünden oldukça önemlidir. Ayrıca kullanılan kimyasal maddelerin elektron mikroskopik standartlara uygun olup olmadıklarına da dikkat etmek gerekir. Elektron mikroskopi için kullanılan kimyasal maddelerin çoğunun toksik olması nedeniyle cilt ile temasına engel olunmalı, solunum yollarına kaçmaması için önlem alınmalıdır. Kimyasallarla bulaşık cam ve diğer malzemeler yıkanmadan ortalıkta bırakılmamalıdır. Zaman içinde buharlaşarak solunum yollarına ulaşabileceği ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır.

Elektron mikroskopi malzemeleri oldukça pahalı olduğu için ekonomik olacak bir çalışma sistemi kurulmalıdır. Örneğin; dokular tek tek değilde toplu olarak takibe alınmalıdır. Bunun için doku tespiti sekonder fiksasyona kadar getirilir, daha sonra buffer içinde bekletilebilir. Takipler haftanın belirli günlerinde yapılabilir. Bufferda bekleme süresi, bufferların hazırlanması sırasında olası hatalar nedeniyle çok uzun tutulmamalıdır. Çok uzun bekleme süresi hücre materyalinin kaybına yol açabilir. Ayrıca takip sırasında küçük cam şişelerin kullanılması kimyasal malzemelerin sarfiyatı açısından önemli kazanç sağlar.

Buffer solüsyonları

Millonig Phosphate Buffer

A solüsyonu:

% 2.26'lık $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 22.6 gr.

Distile Su - 1000 ml.'ye tamamlanır.

B solüsyonu:

% 2.52'lik NaOH - 5.04 gr.

Distile Su - 200 ml.'ye tamamlanır.

A solüsyonundan 830 ml B solüsyonundan 170 ml alınır, karışımın pH'sı 7.3'e ayarlanır. Buffer solüsyonunun pH'sı 7.3'den büyükse A solüsyonundan kullanılır, 7.3'den düşükse B solüsyonundan kullanılır ve pH 7.3'e ayarlanır.

Cacodylate Buffer 0.2 M

A solüsyonu :

Sodyum cacodylate ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) - 42.8 gr

Distile su - 1000 ml.'ye tamamlanır.

B solüsyonu (0.2 M HCl):

Konsantre HCl (% 36-38) - 10 ml.

Distile su - 603 ml.

A solüsyonundan 500 ml. B solüsyonundan 27 ml. alınır karıştırılır. PH 7.4 ayarlanır. 0.2 Molar cacodylate buffer 1:1 oranında distile su ile karıştırılır, 0.1 Molar cacodylate buffer elde edilir. Bu da parafinden elektron mikroskopiye dokunun ters takibi sırasında kullanılır.

Phosphate Buffer Saline (PBS)

Bu buffer elektron mikroskopi laboratuvarında yanlışlıkla formol ile tespit edilmiş dokudan formolün uzaklaştırılması için kullanılır. İki kez 10 dakikalık yıkama işleminden sonra doku normal elektron mikroskopi fiksatifine aktarılabilir.

NaCl - 8.0 gr.

KCl - 0.2 gr.

Anhidr Na_2HPO_4 - 0.92 gr.

Anhidr KH_2PO_4 - 0.2 gr.

Distile su - 1000 ml.'ye tamamlanır.

Bazı durumlarda Na_2HPO_4 susuz formda olmayabilir. Örneğin elimizde $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ varsa; buradaki su moleküllerinin molekül ağırlığını hesaplamalıyız. Daha sonra ambalaj üzerinde yazılı olan molekül ağırlığından çıkarıp ve susuz form için tartmamız gereken miktarı bulmalıyız. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ orijinal ambalaj üzerinde M:177.99 gr/mol (178) olarak molekül ağırlığı verilmiştir. Periyodik cetveldende tek tek her elementin molekül ağırlığını bulup molekül ağırlığını kendimiz de hesaplayabiliriz.

1mol H₂O - 18 gr.

O:16 gr.

H: 1 gr. 2 tane Hidrojen var.

16+1+1:18 gr.

Elimizdeki madde 2 mol su içeriyor.

2x18:36 gr.

178-36:142 gr. Na₂HPO₄'ün susuz formunun molekül ağırlığıdır. Bu maddeden 0.92 gr. almamız gerekiyor.

142 gr. 0.92 gr. alınırsa

178 gr. X gr. alınız

X:1.15 gr tartmamız gerek

Fiksatif solüsyonlarının hazırlanması

Glutaraldehyde Solüsyonu C₅H₈O₂ (% 5 'lik):

Piyasada % 25'lik ve % 50'lik 50-100-250 ml'lik şişelerde bulunmaktadır.

A.Elimizdeki glutaraldehyde solüsyonu % 50'lik ise:

Millonig phosphate buffer - 90 ml.

Glutaraldehyde solüsyonu %50'lik - 10 ml.

B.Elimizdeki glutaraldehyde solüsyonu % 25'lik ise:

Millonig phosphate buffer - 80 ml.

Glutaraldehyde solüsyonu % 25'lik - 20 ml.

Hazırlanan 100 ml. fiksatif %5 glutaraldehyde içerir. Buzdolabında +4°C'de koyu renk cam şişelerde uzun süre saklanabilir.

0.1 M Cacodylate Bufferlı %1'lik Glutaraldehyde

0.2 M Cacodylate buffer - 250 ml.

% 25'lik sıvı glutaraldehyde - 20 ml.

Distile su - 500 ml.'ye tamamlanacak kadar.

20 ml. % 25'lik glutaraldehyde, 250 ml 0.2 M Cacodylate buffer ile karıştırılır. Distile su ile 480 ml'ye tamamlanır. PH'sı 0.1 N NaOH veya 0.1 N HCL ile 7.2'ye ayarlanır. Sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Karnovsky Fiksatif (Karnovsky, 1965)

Bu popüler fiksatif primer fiksatif içinde nisbeten düşük oranda phormaldehyde bulundurulur.

Phormaldehitydin glutaraldehyde ile birlikte kullanılması, dokunun glutaraldehydin tek başına olduğundan daha hızlı korunmasını sağlar. Phormaldehyde dokuya glutaraldehyden 5 kat daha hızlı penetre olmaktadır. Böylece phormaldehyde doku merkezine glutaraldehyden daha önce ulaşır. Böylece hücrel yapılar phormaldehyde ile geçici olarak stabilize edilir ve daha sonra glutaraldehyde doku merkezine ulaşarak daimi stabilizasyonu sağlar.

Karnovsky fiksatif daha çok alışılmıştan büyük (2 mm³'den büyük) dokuların tesbiti için uygundur. Örneğin; sinir dokusu. Ancak bu gün bu fiksatif dokuların elektron mikroskopi laboratuvarına iletilmeden önceki zaman içinde özellikle ameliyat materyalleri için olası otolitik değişiklikleri önlemesi açısından avantaj sağlamaktadır. Karnovsky fiksatifine ilave edilen phormaldehyde osmolariteyi 2110 miliosmol gibi yüksek değerlere çıkarıyor. Memeli fizyolojik sistemlerindeki osmolaliteye (300 miliosmol) göre çok yüksek olan bu değer fiksatif ilave edilen bufferla tamponlanmaktadır. Önerilen tespit süresinin aşılması hızla hücrel materyalin kaybına neden olacağından, laboratuvar saatleri kullanılmalıdır.

100 ml Karnovsky fiksatif için;

Paraphormaldehyde - 4 gr.

Distile su - 48 ml.

NaOH (1 N) - 3 damla.

Cacodylate buffer 0.2 M - 50 ml.

CaCl₂ (%0.2'lik) - 0.8 ml.

% 50'lik glutaraldehyde - 2 ml gereklidir.

Hazırlanışı:

1. 4 gr paraphormaldehyde tartılır (bu tozun solunmamasına ve etrafa saçılmamasına dikkat edilir). 250 ml.'lik bir behere konur.

2. 48 ml.distile su eklenir ve hot-plate üzerinde veya çok kısık ateşte amiyant levha üzerinde, koruyucu bölmede buhar çıkana kadar ısıtılır (60°C). Bundan sonraki tüm basamaklar koruyucu bölmede yapılmalıdır. Soğuması için beklenir.

3. Cam pipet ile 3 damla 1 N NaOH eklenir (1 N KOH'de olabilir). Tortu kalmayacak şekilde iyice karıştırılmalıdır.

4. 50 ml. 0.2 M Cacodylate buffer eklenir, iyice karıştırılır.
5. 2 ml. % 50'lik EM grade glutaraldehyde eklenip, karıştırılır.
6. 0.8 ml. % 0.2'lik CaCl_2 eklenip karıştırılır.
7. PH ölçümü yapılır 7.3 olmalıdır. Hazırlanan fiksatif filtre kağıdından geçirilir, yine koyu renkte cam şişelerde buzdolabında muhafaza edilir. Finalde % 5 glutaraldehyde, % 4 formaldehyde içerir.

1 N NaOH hazırlamak için 40 gr. NaOH bir miktar distile suda çözülür ve 1 lt.'ye tamamlanır.

Osmium tetroxide tespit solüsyonu % 1'lik

Glucose monohydrate - 0.54 gr.

Distile su - 10 ml.

Osmium tetroxide - 1 gr.

Millonig phosphate buffer - 90 ml.

Hazırlanışı:

Temiz koyu renkte bir şişe içine 10 ml. distile su ve 0.54 gr. glukoz ve üzerine 1 gr.lık cam ampül içinde bulunan kristalize osmium tetroxide ampül olarak atılır. Şişenin kapağı sıkıca kapatılır ve şişe kuvvetli bir şekilde çalkalanır, ampulün kırılması sağlanır. Üzerine 90 ml. Millonig phosphate buffer eklenir.

Bu solüsyon hazırlandığı gün kullanılmaz, kristalize osmium tetroxide geç erir, bu yüzden en az bir gece bekledikten sonra kullanılmalıdır. Şişenin ağzı parafilmle kapatılmalı, etrafı aliminyum folya ile sarılmalıdır. Hatta ayrı bir kutu içinde muhafaza edilmesi önerilmektedir.Çünkü çok kolay buhalaşabilen ve temas ettiği her yeri siyaha boyayan bir maddedir. Buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmelidir. Rengi hazırlandıktan hemen sonra çok açık sarıdır, zaman içinde rengi turuncu olabilir. Kahverengine dönüşmüşse kullanılmamalıdır. Hazırlanma tarihi not edilmelidir. Lipid bakımından zengin dokular için % 2'lik osmium tetroxide solüsyonu önerilmektedir.

Rezin embedding medium hazırlanması:

Gömme solüsyonları genellikle epoksi rezin (bazen iki ayrı tip epoksi rezin karıştırılır) anhidridler olan sertleştirici, bir amin olan hızlandırıcı ve plastikleştiricinin (dibutil fitalat) karıştırılmasıyla elde edilir. Değişik markaların kendine özgü hazırlama

ölçülerine dikkat edilir. Gömme solüsyonlarını oluşturan bütün maddeler çok iyi bir şekilde karıştırılmalıdır. Çok iyi bir karışım elde edilmesi de bu amaç için geliştirilmiş karıştırıcılar yardımı ile sağlanabilir. Kesit alınabilir bloklar elde etmek için yukarıda belirtilen maddelerin birbirine oranı oldukça önemlidir. Rezinleri hazırlarken ölçü olarak ayrı tüpler ve şırıngalar kullanılmalıdır. Doku bloklamada kullanılacak rezin solüsyonu hava kabarcıklarının yok olması için birkaç saat dinlendirilmelidir.

Agar Scientific marka Emmedding in Araldite CY212 for Electron Microscopy R1030 için önerilen standart embedding medium oranları aşağıdaki formüllere göre ayarlanabilir.

Formül 1

Araldite CY212 - 20 ml.

DDSA - 20 ml.

BDMA - 1 ml.

Dibutyl phythalate - 2 ml.

Formül 2

Araldite CY212 - 20 ml.

DDSA - 20 ml.

BDMA - 0.6 ml.

Dibutyl phythalate - 1 ml.

Ultramikrotomi

Ultramikrotomi, mikrotomist için çok sabır ve pratik gerektiren bir seri işlem den oluşur. Bıçakların hazırlanması bakımı, temizliği, bilhassa elmas bıçak temizliği ve kullanımı, gridlerin hazırlanması son derece özen ve titizlik gerektirir.

Knife Maker ile özel cam çubuklardan cam bıçaklar hazırlanır. Bu bıçaklara, çok özenle anti-statik bir metal bant kullanılarak havuz yapılır, etrafı saf balmumu ile izole edilir. Bıçağın keskin ucunun korunması ve toz almaması için özel kutularda saklanmalıdır.

Ultramikrotomi, ultramikrotom olarak adlandırılan alet ile plastik içine gömülen dokudan ince ve kalın kesitlerin alınması işlemlerini kapsar. Standart elektron mikroskop elektronları, 150 nm'den kalın biyolojik materyali geçemediğinden kesitlerin çok ince olması gerekir. En iyi resolusyon için ince kesitler 30-60 nm kalınlıkta olmalıdır. En ideal kalınlık

10-20 nm olup bıçak havuzunda kesit rengi gri tonda görülür. 60 nm ve üzeri kesitler sarının açık tonları ve 90 nm sarı renkte görülür(100 nm sarı leylak, 150 nm eflatun, 190 nm mavi eflatun). Kalın kesitler (semi-thin) 0.5-2 mikron arasında alınabilir.

İnce kesitler bakır gridlere aktarılır. Daha sonra kontrastlama işlemine geçilir. Kalın kesitler ışık mikroskopi düzeyinde ilk inceleme için gerekli olup, dokunun pozisyonunu saptamak ve elektron mikroskopta incelenecek alanın belirlenmesi için yapılır. İnce kesit hazırlanmadan 1 mikron kalınlığında kalın kesitlerin yapıp ışık mikroskop düzeyinde kontrol edilmesi pratikte çok uygulanır. Uygun alanlar saptanıp bloklar trimlenir ve ince kesit alınır. Ayrıca trimlenmiş bloklardan ince kesit alındıktan sonrada, post-trim kalın kesitlerin alınır..Post-trim kesitler ince kesit alınması sırasında meydana gelebilecek olası pozisyon değişikliği veya belli bir yapının kesite alınıp alınmadığının saptanması açısından gereklidir. Post-trim kesitler ayrıca kesit tarama sırasında zaman kazanımı sağlar.

Nanometre(nm)	Micron(μ m)	Milimetre(mm)
0.1	0.0001	1×10^{-7}
1	0.001	1×10^{-6}
1000	1	1×10^{-3}

Mikrometre (μ m) terimi micron(μ) yerine kullanılmakta olup eşdeğerdir.

1 mm=1000 μ m

1 μ m=1000 nm

Semi-thin (yarı ince) kesit için toluidin blue boyasının hazırlanması

Di-natrium tetra borat ($B_4Na_2O_7$) - 1 gr.

Distile su - 100 ml.

Toluidin blue - 1 gr.

Hazırlanan solüsyon 30 dakika boyunca iyice karıştırılır, filtre edilir, buzdolabında birkaç ay saklanabilir. Plastik bloklardan cam bıçak havuzuna alınan kesitler buradan uygun bir lup ile lam üzerine aktarılır. Küçük bir kağıt parçası kloroforma batırıldıktan sonra kesitlere temas ettirmemeye özen göstererek hafifçe yaklaştırılır. Böylece rezinin

oluşturduğu kırışmalar enaza indirilmiş olur. Suyun buharlaşması için etüv gövdesinde (60°C) bekletilen lamlar daha sonra alevden geçirilerek plastik kesitlerin cama tespiti sağlanır. Üzerine toluidin blue damlatılır ve etüv gövdesinde yatay pozisyonda kurutulur. Sonra çeşme suyu ile yıkanabilir.

Gpidlere alınan dokuların kontrastlanmasında kullanılan solüsyonların hazırlanması

Uranyl Acetate Solüsyonu:

% 70'lik etil alkol içinde doymuş uranyl acetate solüsyonudur.

Hazırlanışı:

% 70'lik alkol - 100 ml.

Uranyl Acetate - azar azar ilave edilerek eritilir. Doygun hale halinceye kadar bu işleme devam edilir. Şişenin dibinde sarı tortu şeklinde uranyl acetate'nin çözünmeyen kısmı görülür. Bu solüsyon hazırlandıktan bir gün sonra kullanılabilir. Sarı renklidir. Titizlikle hazırlanmalı etrafa sıçratılmamalıdır. Buzdolabında uzun süre saklanabilir.

Uranyl Acetate ile Kontrastlama Yapılması

Kontrastlama işlemi aliminyum folyo ile kaplı petri kutuları içinde yapılmalıdır. Uranyl acetate ile kontrastlada petri içerisine nemli filtre kağıdı konulmalı üzerine de plaka halindeki dişçi balmumu konulmalı. Dişçi balmumu üzerine uranyl acetate damlaları konur. (Bu işlem porselen veya camdan yapılmış, çukurlar içeren malzemelerle de yapılabilir, ancak alkolün çok çabuk buharlaşması ihtimali nedeniyle oluşabilecek artefaktları minimuma indirebilmek açısından ıslak kağıt yerleştirilmiş petri içinde yapılması daha uygundur.) Gridler ince uçlu bir forceps ile damla yüzeyine özenle yerleştirilir. 5 dakika sonra gridler hızlı ve seri bir şekilde distile su serisinden geçirilir. Daha sonra lead citrate ile kontrastlamaya geçilir.

Lead Citrate Solüsyonu:

Lead nitrate $Pb(NO_3)_2$ - 1.33 gr.

Sodium Citrate $Na_3(C_6H_5O_7) \cdot 2H_2O$ - 1.87 gr.

Distile Su (CO_2 free) - 30 ml.

NaOH 1 N - 8 ml.

Bu karışım 50 ml'lik beherde 30 dakika süre ile aralıklı olarak karıştırılır. Bu sırada solüsyon süt gibi homojen beyaz renktedir. Daha sonra üzerine 8 ml 1 N NaOH ilave edilerek çözelti berraklaştırılır. Bu karışım distile su ile 50 ml.'ye tamamlanır. Koyu renk cam şişelerde 3 ay saklanabilir. Şişe üzerine hazırlanma tarihi not edilmelidir. Her iki solüsyonda kullanım öncesinde temiz konik tabanlı tüplerde (5 ml) 5000 devirde santrifüj edilmelidir. Tüpler dikkatli bir şekilde santrifüjden çıkarılmalı ve solüsyonlar tüpün dibine değmeden alınmalıdır. Daha sonra kontrastlama işlemine geçilmelidir.

Lead Citrate ile Kontrastlama Yapılması

Kontrastlama işlemi aliminyum folyo ile kaplı petri kutuları içinde yapılmalıdır. Lead citrate ile kontrastlamada petri içerisine 1 N NaOH ile ıslatılmış filtre kağıdı konulmalı üzerine de plaka halindeki dişçi balmumu konulmalı. Dişçi balmumu üzerine lead citrate damlaları konur. Gridler ince uçlu bir forceps ile damla yüzeyine özenle yerleştirilir. 5 dakika sonra gridler hızlı ve seri bir şekilde CO₂ free distile su serisinden geçirilir. Gridler özel kutularına özenle yerleştirilerek kodlama yapılır. Bu işlem sırasında çok dikkatli olunmalı, gridlerin karıştırılmaması çok önemlidir.

EM için deparafinizasyon işlemleri

Parafin blok üzerinden jilet ile istenilen bölge çıkarılır ve dişçi balmumu üzerinde 1 mm³lük parçalara bölünerek küçük cam şişilere aktarılır. Daha sonra aşağıdaki işlemler uygulanır.

1. % 100'lük Ksilol (70°C'de etüvde) - 15 dakika bekletilir.
2. % 100'lük Ksilol (70°C'de etüvde) - 15 dakika bekletilir.
3. % 100'lük Ksilol (Oda ısısında) - 15 dakika bekletilir.
4. 1:1 Ksilol-Etanol (Oda ısısında) - 15 dakika bekletilir.
5. % 100'lük Etanol (Oda ısısında) - 60 dakika bekletilir.

6. % 50'lik Etanol (Oda ısısında) - 10 dakika bekletilir.

7. 0.1 M Cacodylate buffer - 10 dakika bekletilir.

8. Karnovsky fiksatif - 60 dakika bekletilir.

9. Buffer ile iki kez - 10 dakika yıkanır.

10. Osmium tetroxide ile tespit edilir - 2 saat .

11. Buffer ile iki kez - 10 dakika yıkanır.

12. Normal elektron mikroskopi takibindeki dehidratasyon ve infiltrasyon işlemlerine devam edilir.

Kaynaklar

1. Agar AW, Alderson RH, Bassett GA, Bradley DE, Brammer IS, Glauret AM: Techniques for Electron Microscopy, Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh, 1965.
2. Bozzola JJ, Russell LD: Electron Microscopy Principles and Techniques for Biologists. Copyright 1999, 1992 by Jones and Bartlett Publishers, Inc.
3. Glauret AM: Practical Methods in Electron Microscopy, Strangeways Research Laboratory Cambridge, England, 1975.
4. Glauret AM: Practical Methods in Electron Microscopy, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1977.
5. Kaya M: Elektron Mikroskopi Teknikleri: Ç.Ü Tıp Fak.Der./Eki, 1984.
6. Maunsbach AB, Afzelius BA: Biomedikal Elektron Mikroskopy. Academic Press a Division of Harcourt Brace&Company, California-USA, 1999.