

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



TIBBİ BİYOLOJİ LABORATUVAR KILAVUZU

Doç. Dr. Hilal ARIKOĞLU
Dr.Öğrt.Ü. Dudu ERKOÇ KAYA



ÖĞRENCİNİN

ADI VE SOYADI :.....

FAKÜLTE NUMARASI :.....

LABORATUVAR GRUBU :.....

LABORATUVAR MASASI :.....

CALIŞMALARIN KONU BAŞLIKLARI

1. Çalışma I: Laboratuvar Kuralları, Donanım.....	1
2. Çalışma II: Işık Mikroskobu ve Kullanımının Öğrenilmesi.....	6
3. Çalışma II.I. Işık mikroskobunda Görüntü Oluşumu.....	17
4. Çalışma III: Hücre.....	18
Çalışma III.I. Bitkisel Hücrenin Mikroskopta İncelenmesi.....	19
Çalışma III.II. Hayvansal Hücrenin Mikroskopta İncelenmesi.....	20
4. Çalışma IV: Özelleşmiş Hücreler.....	21
Çalışma IV.I. Patates Nişasta Depo Hücrelerinin İncelenmesi.....	21
5. Çalışma V: Bakteriler.....	22
Çalışma V.I. Et Suyu Bakterilerinin İncelenmesi.....	23
Çalışma V. II. Yoğurt Suyu Bakterilerinin İncelenmesi.....	23
6. Çalışma VI: DNA İzolasyonu.....	24
Çalışma VI.I. Muzdan DNA İzolasyonu.....	25
7. Çalışma VII: RNA İzolasyonu.....	26
Çalışma VII.I. Kandan RNA İzolasyonu.....	28
8. Çalışma VIII: Nükleik Asit Analiz Yöntemleri.....	30
Çalışma VIII.I. Spektrofotometrik Yöntemle Nükleik Asit Kantitasyonu.....	30
Çalışma VIII.II. Agaroz Jel Elektrophorez Yöntemi İle Nükleik Asit Analizi.....	32
9. Çalışma IX: Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve RT-PCR.....	34
Çalışma IX.I. PZR.....	34
Çalışma IX.II. RT-PCR.....	36
10. Çalışma X. Kan Hücreleri ve Barr Cisimciği.....	38
Çalışma X.I. Kan yayma Preparatının Hazırlanması ve Kan Hücrelerinin İncelenmesi.....	41
Çalışma X.II. Barr Cisimciğinin (İnaktif X Kromozomu) Gözlenmesi.....	41
11. Çalışma XI: Mitoz.....	42
Çalışma XI.I. Soğan Bitkisinin Çimlendirilmiş Kök Uçlarında Mitozun Gözlenmesi.....	43

1. ÇALIŞMA I: LABORATUVAR KURALLARI VE DONANIMI

Tıp eğitimi, uygulamanın zorunlu olduğu bir eğitim dalıdır. Öğrenciler edindikleri teorik bilgileri, laboratuvar pratiklerinde edindikleri tecrübeler ile birleştirdiklerinde, insana ilişkin bilgilerin öğrenilmesi ve kavranabilmesi daha kolay hale gelir.

Hedeflenen verimlilikte bir laboratuvar çalışmasının yapılabilmesi ve çalışma ortamlarında meydana gelebilecek kaza ve enfeksiyon risklerinin en aza indirilebilmesi ancak belirli bir disiplin içinde ve temel laboratuvar kurallarına uyularak başarılabilir. Tıbbi Biyoloji laboratuvar çalışmaları süresince uyulması gereken bu temel güvenlik kuralları aşağıda verilmiştir.

1. Laboratuvarda beyaz önlük giyilmesi zorunludur. Çalışmanın niteliğine göre gerektiğinde eldiven ve maske kullanılmalıdır.
2. Laboratuvara başlamadan önce yapılacak deneyler ile ilgili teorik bilgiler okunmalı ve getirilmesi istenilen araç-gereçler mutlaka getirilmelidir.
3. Sözlü veya yazılı bütün kurallara dikkatle uyulmalı, deneyden önce laboratuvar sorumlularının deney ile ilgili açıklamaları dikkatle dinlenmeli ve titizlikle uygulanmalıdır.
4. Laboratuvar çalışmalarında mikroskop kullanılacaksa mikroskobun taşınma ve kullanımına dikkat edilmelidir. Çalışmaya başlamadan önce ve sonra mutlaka temiz bir bezle silinmelidir. Her öğrencinin bir adet gözlük temizleme bezi çalışma sırasında yanlarında mutlaka olmalıdır.
5. Çalışma sırasında masaların üzerinde sadece gerekli araç ve gereçler ile not almak için laboratuvar kılavuzu bulunmalıdır.
6. Çalışma esnasında saçlar uzun ise mutlaka toplanmalıdır.
7. Laboratuvarda yemek, içmek ve gıda maddelerinin bulundurulması yasaktır.
8. Çalışma sırasında kullanılan araç ve gereçler dikkatli bir biçimde kullanılmalıdır. Çatlak ve kırık cam eşyalar kullanılmamalıdır. Çalışma sırasında araç ve gereçlerde oluşabilecek hasarlar mutlaka görevli öğretim elemanına bildirilmelidir.

9. Kimyasal maddelere dokunmak, koklamak ve tatmak kesinlikle yasaktır. Laboratuvarda çalışılırken ağız yoluyla sıvı çekilmemelidir. Puar kullanılmalıdır.
10. Çalışma sırasında oluşabilecek kazalar, yaralanmalar (kesik, yanık gibi) derhal ilgili öğretim elemanına bildirilmelidir. Gerekli müdahale anında yapılmalıdır.
11. Laboratuvar çalışmasının bitiminde, kullanılan cihazlar ve çalışma alanı temizlenmeli, kullanılan materyaller (preparat, tüp vs) çöpe atılmalı, masaların üzeri temiz bırakılmalıdır. Çalışma atıkları eğer tehlike arz ediyorsa (bistüri, jilet, enjektör gibi) öğretim elemanının göstereceği ayrı bir atık kutusuna atılmalıdır.
12. Su muslukları, elektrik düğmeleri ve mikroskopların ışıkları çalışılmadığı durumlarda kapatılmalıdır.

TIBBİ BİYOLOJİ LABORATUARININ DONANIMI

A) ÖĞRENCİ LABORATUVARLARINDA KULLANILAN PLASTİK VE CAM MALZEMELER

- 1- **Lam:** Preparat hazırlamada kullanılan büyük cam malzemedir.
- 2- **Lamel:** Preparat hazırlamada kullanılan, genellikle incelenecek materyalin üzerine kapatılan küçük cam malzemedir.
- 3- **Şale:** Preparat boyamada kullanılan, içlerinde 4-7 adet lamın uzun yada kısa kenarı üzerinde dik durmasını sağlayan oyuklar bulunan yatık ya da dikey cam kaptır.
- 4- **Pastör Pipeti:** Küçük miktarlarda (1-3 ml) sıvıların aktarılmasında kullanılan plastik pipetlerdir.
- 5- **Cam Pipet:** Daha büyük miktarlarda (1-50 ml) sıvı çekmede ve aktarmada kullanılan ölçekli cam pipetlerdir.
- 6- **Otomatik Pipet:** Hassas ölçümlerde (0,1-1000 μ l) kullanılan ve üzerlerinde hakim ayarlama, çekme ve boşaltma işlemleriyle ilgili donanımı bulunan ve bir kez kullanılarak atılabilen uçları olan özel pipetlerdir.
- 7- **Beher:** Ölçekli veya ölçeksiz, cam veya plastik kaplar. Sıvıların hacimlerini karıştırmak için kullanılan ve 20, 50, 100, 200, 400, 500, 1000 ml hacimlerinde olabilen plastik veya cam malzemelerdir.
- 8- **Balon Joje:** Çözelti hazırlamada ve saklamada kullanılan boyun kısmı tüp şeklinde, alt kısmı küre şeklinde cam malzemedir.

- 9- **Erlenmayer:** Çözelti hazırlamada kullanılan, konimsi bir boyna ve düz bir dip kısma sahip olan, 20, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2000 ml hacimlerinde olabilen cam malzemelerdir.
- 10- **Petri Kabı:** İçerisine besi yeri dökülen, bakteri ve maya gibi canlıların üretilmesinde kullanılan yuvarlak kapaklı plastik ya da cam kaplardır. 6, 8, 10, 12 ve 15 cm çaplarında olabilen çeşitleri bulunmaktadır.
- 11- **Eppendorf Tüpü:** 0,5-1,5 ml kapasitesi olan kapaklı plastik küçük tüplerdir.
- 12- **PZR Tüpü:** 0,2-0,5 ml kapasitesi olan kapaklı plastik küçük tüplerdir.
- 13- **Falkon Tüpü:** 15, 25 ve 50 ml kapasitesi olan kapaklı plastik büyük tüplerdir.
- 14- **Mezür:** Sıvıların hacimlerinin ölçülmesinde kullanılan silindir biçiminde, dereceli cam veya plastik kaplar. 10, 20, 50, 100, 250, 500 ve 1000 ml hacimleri bulunan dereceli malzemelerdir.
- 15- **Bistüri:** Preparat hazırlarken ve/veya dokuları parçalarken materyallerin kesilmesinde kullanılan keskin steril bıçaklardır.
- 16- **Puar:** Cam pipetlerin ucuna takılarak sıvı çekmeye yarayan plastik alettir.

B) LABORATUVAR ALETLERİ

- 1- **Mikroskop:** Laboratuvarın temel aracı olan ve pek çok çalışmadaki en önemli analiz aracı olan mikroskopa ilişkin geniş bilgi ileride verilmiştir.
- 2- **Santrifüj:** Bir solüsyondaki katı maddeleri sıvı kısmından kabaca ayırmakta kullanılır. çözeltideki maddelerin yoğunluklarına göre ayrımını sağlar. Santrifüj cihazına tüpler yerleştirilirken hepsinin eşit ağırlıkta olmalarına ve tam karşılıklı yerleştirilmelerine dikkat edilir. Dakikadaki dönme hızı ve süresi ayarlanır. Santrifüjler, klinik laboratuvarlarda genellikle kanın pıhtılaşmasını sağlayarak serum veya plazmayı ayırma amacıyla kullanılır.
- 3- **Ph Metre:** Sıvı materyallerin pH dengesini ölçmede kullanılan bir araçtır.
- 4- **Kaba ve Hassas Ölçekli Teraziler:** Gram ve miligram düzeyindeki ağırlıkları ölçmede kullanılan . Özellikle çözelti hazırlanması sırasında katı maddelerin tartılması ve biyolojik doku örneklerinin ağırlıklarının belirlenmesi için kullanılan, hassasiyeti oldukça yüksek aletlerdir. Kaba ölçümler için düşük hassasiyetli (adi/kaba terazi) teraziler, ince ölçümler için hassas teraziler kullanılır.

- 5- Manyetik Karıştırıcı:** Üst kısmında yatay bir manyetik yüzey bulunan bu aletin ayrıca mıknatıs özelliğinde üzeri plastikle kaplı küçük çubuk şeklinde manyetik karıştırıcıları bulunur. Hazırlanması istenilen çözelti bir kap içerisinde aletin üzerine konular, manyetik çubuk içine atılır, manyetik etkileşim ile dönen çubuk sayesinde çözelti içinde maddelerin homojen bir biçimde çözünmesi sağlanmış olur.
- 6- Vorteks:** Küçük tüplerdeki az miktardaki sıvının karıştırılmasında kullanılan alettir. Sabit bir mil üzerinde dönen tek bir döner başlığa sahip olan bu aletler, deney tüpü içindeki reaktiflerin karışarak homojen hale gelmesini sağlarlar. Dönüş hızı, istenilen hıza ayarlanmak sureti ile tüp içeriği karıştırılmış olur.
- 7- Su Banyosu (Benmari):** İçine su konularak ısıtılmasını sağlayan ısı ve zaman ayarlı, kapaklı bir cihazdır. Belirli bir sürede ve sıcaklıkta inkübasyon gerektiren işlemlerde, donmuş madde çözünmesi ya da maddelerin istenilen ısıda tutulması gereken durumlarda kullanılır.
- 8- Etüv:** Dış ortamdan iyi izole edilmiş bir ortamda yüksek ısı derecelerine kadar ayarlanabilen ve termostatı sayesinde ayarlanan derecede sürekli tutulabilen bir araçtır. Karbondioksitli ya da vakumlu gibi tipleri vardır. Belirli ısılarda inkübasyon gerektiren doku ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılırlar.
- 9- Laminar Kabin:** İçi steril, kapalı ya da yarı açık çalışılabilen bir alettir. Hücre kültürü, sitogenetik ve moleküler genetik çalışmaların steril çalışma ortamları gerektiren aşamalarında, kullanılan hava sirkülasyonunun olduğu güvenlik kabinleridir.
- 10- Isı Döngülü Cihaz (PCR cihazı):** Polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla, DNA'nın belirli bir bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan ve farklı sıcaklık basamaklarında döngüsel çalışan cihazlardır. Üzerinde, PCR karışımı içeren küçük tüplerin konulabileceği küçük yuvalar bulunan bu cihaz, önceden programlanan adımlara göre tüp yuvalarının sıcaklıklarını artırıp azaltarak çalışır.
- 11- Elektroforez (yatay ve dikey):** Yüklü taneciklerin veya moleküllerin elektrik akımının etkisi ile birbirinden ayrılması için kullanılan cihazlardır. Elektriksel alanda (+) yüklü tanecikler (katyonlar), (-) kutba (katoda); (-) yüklü tanecikler (anyonlar), (+) kutba (anoda) doğru hareket ederler. Ortamda moleküllerin hareket hızları, molekülün yükü, şekli, büyüklüğü, elektrik alanının kuvveti ve destek ortamının özelliğine bağlıdır. Yüklü moleküllerin hareket ettiği destek ortamının özelliğine göre; agaroz jel elektrofrez, poliakriamid jel elektrofrez, kapiller elektrofrez vs. gibi değişik elektrofrez çeşitlerinden bahsedilebilir.
- 12- UV Transilüminatörü:** Ultraviyole (UV) ışık altında elektrofrez jellerinin görüntülenebilmesini sağlayan alettir.
- 13- Çeker Ocak:** Çalışmalar esnasında ortaya çıkan zararlı gazların ve buharların uzaklaştırılmasında ve laboratuvarların havalandırılmasında kullanılan kabinlerdir.

14- Çalkalayıcı (Shaker): Hazırlanan deney tüplerinin bir süre için belli bir hızda çalkalanmasını sağlar. İnkübasyon sırasında çalkalama istenen deneylerde kullanılır. Çalkalama sıklığı ayarlanabilir.

15- Buzdolabı ve derin dondurucu: Örneklerin ve malzemelerin muhafaza edildiği, kısa ve uzun süreli saklandığı laboratuvar aracıdır.

C) LABORATUVAR ÇALIŞMALARINDA İZLENECEK YOL VE ÇALIŞMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Laboratuvarda çalışma öncesi, çalışılacak konu ile ilgili gerekli ön hazırlıklar yapılmalı, çalışılacak ortam uygun hale getirilmeli, kullanılacak araç gereçler de çalışma konusuna uygun olarak önceden hazırlanmalıdır.

Çalışma sırasında temel laboratuvar kurallarına uyularak deney tamamlanmalı ve çalışma amacı, kullanılan araç-gereç ile çalışma yöntemi, elde edilen veriler ve elde edilme koşullarını içeren açıklayıcı bir rapor hazırlanmalıdır. Doğru adımlarla tamamlanmış bir laboratuvar çalışmasına ait değerlendirme raporunda, özetle aşağıdaki gibi bir sıralama yer alır:

Amaç: Deneyin yapılma amacı bu bölüme yazılır

Materyal ve metod: Çalışmada kullanılan araçlar ve malzemeler ile ilgili bilgiler ve çalışma süresince kullanılan yöntemlere dair tüm uygulamaların sırası bu bölümde yer alır.

Bulgular: Çıkan sonuçlara ilişkin bulgular, şekil ve grafikler ya da tablolar aracılığıyla ve varsa kontrol gruplarıyla da karşılaştırılarak burada sunulur.

Tartışma ve sonuç: Bu bölümde, sonuçlar tartışılarak, aynı konudaki diğer çalışmalarla karşılaştırmalar yapılır ve bunların ışığında elde edilen sonuçlarla başlangıçta hedeflenen amaca ne kadar ulaşıldığına dair bilgi özetlenir.

ÇALIŞMA II: IŞIK MİKROSKOBU VE KULLANIMININ ÖĞRENİLMESİ

A-MİKROSKOP:

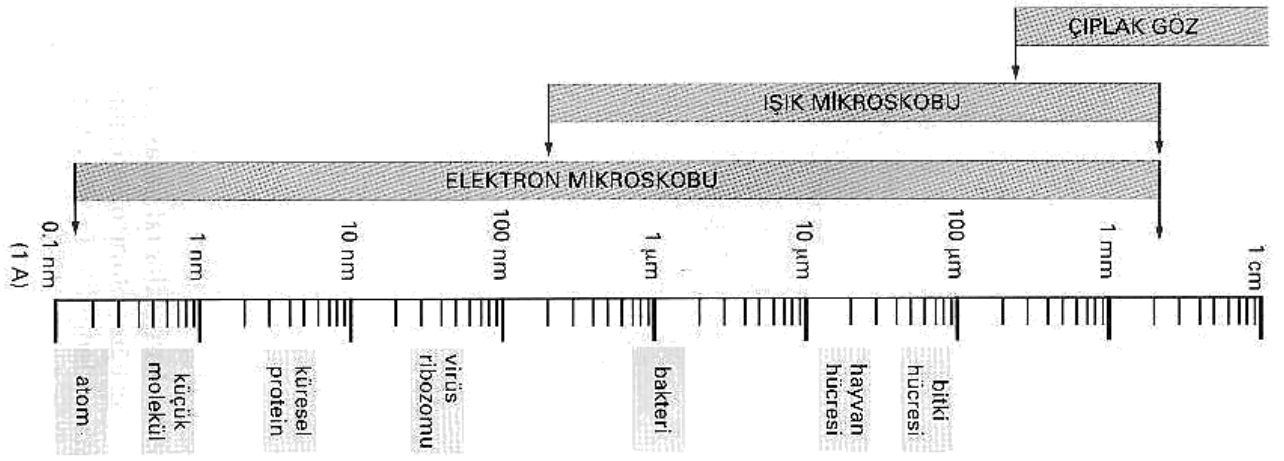
Mikroskop sözcüğü; çok küçük anlamına gelen *micro* ve nesnelere bakmaya yarayan bir aygıt anlamına gelen *scope* sözcüklerinden türetilmiştir. Mikroskop gözle görülemeyecek büyüklükteki yapıları, büyüterek görülmesini sağlayan mercekler sistemidir.

Hücrelerin çoğu çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük olduklarından, hücre çalışmaları ağırlıklı olarak mikroskop kullanımı gerektirir. Kişisel farklılıklar gösterse de insan gözü 0,1 mm' den daha küçük cisimleri ayırt edemez. Mikroskop sahip olduğu mercekler sistemiyle gözün görme sınırını genişletir ve böylece gözle görülemeyen cisimleri görülebilir hale getirir. İyi bir ışık mikroskobu 0,25 µ (mikron) kadar yakın iki noktayı ayırabilir.

Hücrelerin keşfi mikroskobun geliştirilmesinden doğmuştur: Robert Hook 1665'de basit bir ışık mikroskobu ile bir şişe mantarı parçasını gözlemleyerek "hücre" sözcüğünü ilk kez kullanmıştır.

Antony van Leeuwenhoek 1670'lerde, boyutlarının 300 katı kadar büyüten mikroskop geliştirerek; sperm, kırmızı kan hücresi ve bakteriler gibi farklı türde çeşitli hücreleri gözleyebilmiştir. Hücre teorisinin 1838'de Matthias Schleiden ve Theodor Schwann tarafından ortaya atılması, çağdaş hücre biyolojisinin doğuşu olarak kabul edilmiştir. Böylece **hücre**, bütün canlı organizmaların temel birimi şeklindeki yaygın tanımını elde etmiştir.

Mikroskoplar temelde aynı özelliklere sahip olmalarına rağmen zamanla farklı amaçlara göre geliştirilerek farklılıklar göstermişlerdir. Kullanılan aydınlatma kaynağına göre ışık mikroskopları ve elektron mikroskobu olarak temel iki gruba ayrılabilirler. Öğrenci laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan mikroskop çeşidi "Aydınlık Saha (Işık) Mikroskobu" dur. Aşağıda görülen logaritmik cetvel; çıplak göz, ışık mikroskobu ve elektron mikroskobunun görüntüleme alanlarını göstermektedir.



Ölçü birimi olarak ışık mikroskopide mikrometre (10^{-6} m) kullanılmaktadır. Elektron mikroskopide ise Angström (10^{-10} m) ve son yıllarda nanometre (10^{-9} m) kullanılmaktadır.

ÖLÇÜ BİRİMLERİ

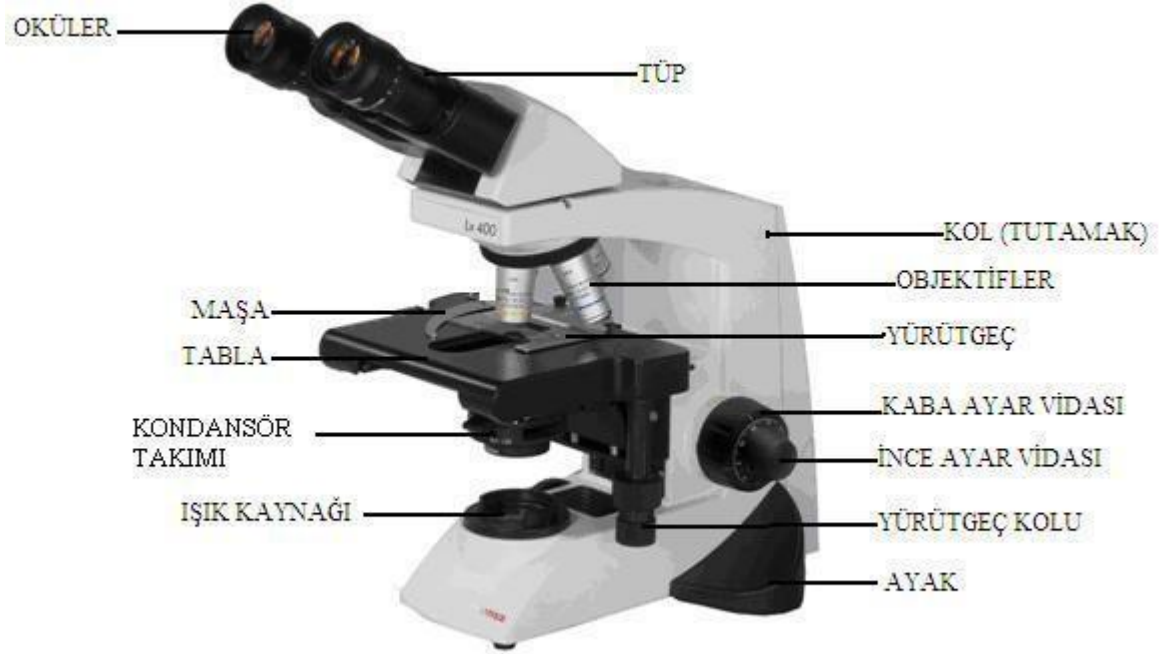
$$\text{\AA ngström (\AA)} = 10^{-10} \text{ m} = 10^{-7} \text{ mm} = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-1} \text{ nm}$$

$$\text{Nanometre (nm)} = 10^{-9} \text{ m} = 10^{-6} \text{ mm} = 10^{-3} \mu\text{m} = 10 \text{ \AA}$$

$$\text{Mikrometre (\mu m)} = 10^{-6} \text{ m} = 10^{-3} \text{ mm} = 10^3 \text{ nm} = 10^4 \text{ \AA}$$

B-IŞIK MİKROSKOBUNUN KISIMLARI

Işık mikroskobu, mercekler sistemi (optik sistem) ve bu sistemleri taşıyan mekanik kısımlardan oluşmuştur.



Resim 1. Aydınlık Saha (Işık) mikroskobu ve kısımları

OPTİK KISIMLAR

- 1- Oküler:** Mikroskobun tüp kısmına yerleşmiş, gözün baktığı mercekler sistemidir. Öğrenci ışık mikroskopları tek (monooküler) veya iki (binoküler) okülerli olabilir. Büyütme gücü üzerinde yazılı olup genellikle 10X büyütme gücündedir.
- 2- Objektif:** Döner tabla üzerine vidalanmış mercekler sistemidir. Genellikle bir mikroskopta X4 veya X5, X10, X40 ve X100 büyütme gücünde 4 adet objektif bulunur. Objektifler kuru sistemli ve immersiyon olmak üzere ikiye ayrılırlar. Kuru sistemli (X4/X5, X10 ve X40) objektiflerde preparat ile objektif arasında hava bulunur. İmmersiyon objektifinde (X100) ise preparat ile objektif arasında immersiyon (sedir) yağı damlatılarak inceleme yapılır. Amaç, ışığın havada kırınımını önleyerek daha yoğun bir biçimde objektife aktarılmasıdır. Böylece görüntü daha net elde edilir.
- 3- Kondansör Takımı (Toplayıcı Mercek):** Işık kaynağından gelen ışığı bir noktada yoğunlaştırarak preparata yönlendiren sistemdir. Kondansör takımında ihtiyaç duyulduğunda renkli filtrelerin

takılabileceği kısım bulunur. Onun üzerinde bir kol yardımıyla ışık miktarının ayarlandığı diyafram bulunur. En üst kısmında ise ışığı yoğunlaştırma işlemini yapan kondansör merceği bulunur. Kondansör takımı, mikroskobun büyütme oranını etkilememekle birlikte görüntü kalitesini önemli ölçüde etkiler.

4- Işık Kaynağı: Kondansör takımının altında görüntünün elde edilebilmesi için gerekli olan ışığı sağlayan aydınlatma lambası ya da aynadır. Aynanın bir yüzü çukur bir yüzü ise düzdür. Gereken ışık miktarına göre aynanın uygun yüzü ışığa çevrilerek ışık kondansör takımına iletilir. Ayna yerine lambanın olduğu mikroskoplarda ise kondansöre iletilecek ışığın miktarı bir düğme aracılığı ile kısılıp açılabilir.

MEKANİK KISIMLAR

1- Tüp: Üst kısmına okülerin yerleştirildiği genelde boru şeklindeki metal kısımdır. Tüplerin uzunluğunun mikroskobun büyütme derecesi üzerinde etkisi vardır. Tüpün alt kısmında objektifleri taşıyan revolver kısmı vardır.

2- Kol (tutamak): Mikroskobu taşırken elle tutulan kısımdır. Ayağa bağlı olup mikroskobun tüm parçalarını taşır.

3- Tabla: Mikroskopta çalışılacak preparatın konulduğu, ışık kaynağından gelen ışığın preparata yansması için orta kısmı delik olan, üzerinde preparatı tutmaya yarayan maşa ve preparatı hareket ettirmeye yarayan yürütgecin bulunduğu metal parçadır. Bazı mikroskoplarda sabit bazılarında ise aşağı yukarı doğru hareket edebilir.

4- Maşa: Tablanın üzerinde bulunan ve preparatı tabla üzerinde sabit tutmaya yarayan yassı metal tutucudur.

5- Yürütgeç (şaryo): Tabla üzerinde bulunan ve preparatı sağa sola ve ileri geri hareket ettiren düzenektir. Üzerinde elde edilen görüntülerin koordinatlarını belirlemeye yarayan yatay ve dikey konumdaki **nonius bölüntüleri** denilen ölçekler bulunabilir.

6- Vidalar: Görüntüyü netleştirmek için kullanılırlar. Kaba ayar vidası (makrovida) ve ince ayar vidası (mikrovida) olmak üzere iki vida bulunur. Vidalar, incelenen cisim ile objektif arasındaki uzaklığı ayarlayarak görüntünün elde edilmesini ve netleşmesini sağlar.

7- Ayak: Mikroskobun dengede durmasını sağlayan kısımdır

C- MİKROSKOBUN BÜYÜTME GÜCÜ

Mikroskopun büyütme gücü, okülerin büyütme gücü ile objektifin büyütme gücüne bağlıdır. Oküler ve objektiflerin büyütme güçlerinin çarpımı mikroskopun büyütme gücünü gösterir ve aşağıdaki şekilde formüle edilir:

Mikroskop büyütme gücü (MB) = Oküler büyütme gücü x objektif büyütme gücü

Oküler büyütme gücü 10x olan bir ışık mikroskobu için objektiflere göre büyütme gücü MB= 10x5; MB= 10x10; MB= 10x40; MB= 10x100 şeklindedir. MB= 10x100 olan bir ışık mikroskopunda incelenen örnek 1000 kez büyütülerek görüntüleniyor anlamındadır.

Büyütmenin sınırsız olarak artırılması, sanıldığı gibi tersine görüntüyü giderek iyileştirmez. Çünkü, görüntünün niteliği mikroskopun yalnızca büyütme gücüne değil, aynı zamanda ayırma gücüne de bağlıdır. Görüntüler istenildiği kadar büyütülebilir (örneğin, büyük bir perdeye yansıtılarak), ancak, bu şekilde büyütme, gözlenebilen detay düzeyini artırmaz.

Ayrırma gücü (Çözünürlük), bir mikroskopun çok küçük ya da birbirine çok yakın cisimlerin görüntülerini ayırabilme ya da birbirlerinden ayrı halde oluşturabilme yeteneğidir; bu yetenek ışığın dalga boyu özelliğiyle sınırlıdır.

Ayrırma Gücü

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda}{A}$$

λ = ışığın dalga boyu

d = iki nokta arasındaki mesafe,

α = odak noktasından ölçülen kırılma çizgilerinin yarı açılma açısı (giriş açısı),

n = cisim veya numune ile optik sistem arasındaki ortamın kırılma indisidir.

A (numerik apertür) = n.sin α çarpımı bir ışık demetinin açılımını ve tek büyütme ile objektifin gücünü karakterize eder. Bu açıklık; objektifin “numerik apertürü” olarak adlandırılmaktadır. Başka bir deyişle, numerik apertür, mikroskop merceğinin ışık toplama gücüdür.

D-MİKROSKOBUN KULLANIMA HAZIRLANMASI

Mikroskoplar dikkatli kullanım isteyen hassas cihazlardır. Bu nedenle her çalışmada aşağıdaki kurallara dikkat edilmesi gerekir.

1. Mikroskop, bir elle tutamaktan diğer elle ayak kısmının altından desteklenerek, daima iki elle taşınmalıdır.
2. Mikroskop masanın kenarından yaklaşık 10 cm uzağına, tutamak kısmı çalışana bakacak şekilde konur.
3. Temiz bir gözlük temizleme beziyle mikroskop temizlenir. Özellikle objektifler ve oküler çalışmalara başlamadan önce ve sonra mutlaka temizlenmelidir. Optik sisteme zarar verebilecek sert bez veya kağıt mendil asla kullanılmaz.
4. Preparatın konulacağı tabla kaba ayar vidası (makrovida) ile en alta indirilir.
5. Mikroskopun fişi prize takılır.

E- MİKROSKOBUN KULLANIMI

1. En küçük objektif tablaya dik konuma getirilir. Objektifin yerine oturduğu “**tık**” sesinden anlaşılır.
2. Okülerden bakıldığında parlak yuvarlak bir alan görülmelidir.
3. Hazırlanan preparat tablanın üzerine maşa yardımıyla yerleştirilir. Preparattaki incelenecek materyalin olduğu kısım, tablanın ortasında bulunan deliğin üzerine yürütgeç yardımıyla getirilir.
4. Işık miktarı incelenecek materyalin özelliğine göre ayarlanır.
5. Kaba ayar vidası yardımıyla preparat tablası yavaş yavaş yukarıya, görüntü elde edilinceye kadar kaldırılır.
6. Görüntü elde edilince yürütgeç yardımıyla saha taraması yapılır.
7. İstenilen görüntü bulununca görüntünün çizimi yapılır. Çizim yaparken asla daire veya kare içine alınmaz. Her çizimin altına mikroskopun büyütme gücü (MB) ve inceleme ortamı (İO) yazılır.
8. En küçük objektifte inceleme tamamlandıktan sonra X10 objektife geçilir.
9. X10 objektife geçerken preparat ya da kaba ayar vidası ile oynanmaz. Direk X10 objektif tablaya dik konuma getirilir, **tık** sesi duyulur.
10. Eğer sahada görüntü varsa sadece ince ayar vidası yardımıyla görüntü netleştirilir. Ama görüntü yoksa çok dikkatli bir şekilde kaba ayar vidası kullanılabilir.
11. Görüntü netleştirildikten sonra yürütgeç yardımıyla istenilen görüntü bulunur. Çizimi yapılır.
12. X40 objektife geçilirken, objektif daha dikkatli bir şekilde hareket ettirilerek tablaya dik konuma getirilir.

13. X40 objektifde çalışırken sadece mikrovida (ince ayar vidası) kullanılarak görüntün netlik ayarı yapılır.
14. İstenilen görüntünün çizimi yapılır.
15. X100 objektife geçerken yine sadece ince ayar vidası kullanılır. Objektif yerleştirilmeden önce bir damla immersiyon yağı konur.
16. Çalışma bittikten sonra en küçük objektif tablaya dik konuma getirilir.
17. Preparat çıkarılır.
18. Tabla en alt konuma getirilir.
19. Objektif ve oküler temizlenir. Şayet immersiyon yağı kullanılmışsa, X100 objektif yağ kurumadan iyice temizlenmelidir.
20. Mikroskopun fişi prizden çıkarılır.

F- MİKROSKOP KULLANIRKEN DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

1. Çalışırken objektiflerin tam olarak yerleştiğinden emin olunmalıdır. Bu “**tık**” sesiyle anlaşılır. Eğer objektifler yerine oturmazsa görüntü alanı yuvarlak olmaz, bir kısmı karanlık kalır. Bu da çalışma kalitesini düşürür.
2. Büyük objektiflerde inceleme yaparken kaba ayar vidası dikkatli kullanılmalıdır. Aksi takdirde objektif preparata çarpabilir, preparat kırılabilir ve objektif zarar görebilir.
3. Şeffaf materyaller (hücre gibi) incelenirken diyafram aracılığı ile ışık mutlaka kısılmalıdır. Yoksa görüntü fark edilmeyebilir. Tersine, boyalı preparatlarda ışık miktarı artırılmalıdır, yoksa tamamen karanlık görülebilir, ayrıntılar seçilemez.
4. Çalışma sırasında preparattan su ya da boyanın taşması durumunda, preparat çıkarılmalı, iyice kurulmalı, mikroskopun tabla ve objektifleri iyice temizlenip kurulmalıdır.
5. Preparat hazırlanırken, çalışmaya ara verildiğinde ya da çalışma bittiğinde mikroskopların açma/kapama düğmeleri kapatılmalıdır veya fişi prizden çıkarılmalıdır.
6. Mikroskop kullanırken vidalar zorlanmamalıdır.
7. Herhangi bir problemle karşılaşıldığında mutlaka öğretim elemanına haber verilmelidir.

G- PREPARAT HAZIRLANMASI

Preparat hazırlarken, lam ve lamel olmak üzere iki farklı cam malzeme kullanılır; Öncelikle lam ve lamel temizlenir. Daha sonra lamın orta kısmına plastik pipet yardımıyla 1-2 damla su damlatılır. İncelenecek materyal suyun üzerine konulur. Lamel 45⁰C lik açılı ile incelenecek materyalin üzerine yavaşça kapatılır (Resim2)



Resim 2. Preparat hazırlanması

PREPARAT HAZIRLARKEN DİKKAT EDİLMESİ GEREKENLER

1. Lam ve lamel temiz olmalıdır.
2. Su, lamdan taşacak kadar çok olmamalıdır (1-2 damla).
3. İncelenecek materyal oldukça ince ve küçük olmalıdır. Lamel kapatıldığında dışarı taşmamalıdır.
4. Lamel kapatılırken yavaşça ve 45°C lik açıyla kapatılmasına özen gösterilmelidir. Aksi takdirde çok fazla hava kabarcığı oluşacağından görüntü kalitesinde düşme olacaktır.
5. Lamel kapatıldığında lam ve lamelin alt ve üst kenarları birbiriyle örtüşmelidir.
6. Dikkat edilmesine rağmen, su ya da boyanın taşması durumunda kurutma kağıdı ile mutlaka iyice kurulanmalıdır. Daha sonra mikroskoba yerleştirilmelidir.

Çalışma II.I: Işık mikroskobunda görüntü oluşumu

Amaç: Gazeteden kesilmiş herhangi bir harfin mikroskopta incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, gazete parçası, makas

Yöntem: Bir gazete veya dergiden küçük puntuyla yazılmış bir harf (a harfi) kesiniz. Lamın ortasına bu harfi okunduğu şekliyle koyunuz. Lameli düzgünce kapatınız. Sırasıyla X4/X5, X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. Gördüklerinizi yorumlayınız ve şekillerini çiziniz.

M.B:

İ.O:

*

Sonuç ve Yorum:

M.B:

İ.O:

*

Sonuç ve Yorum:

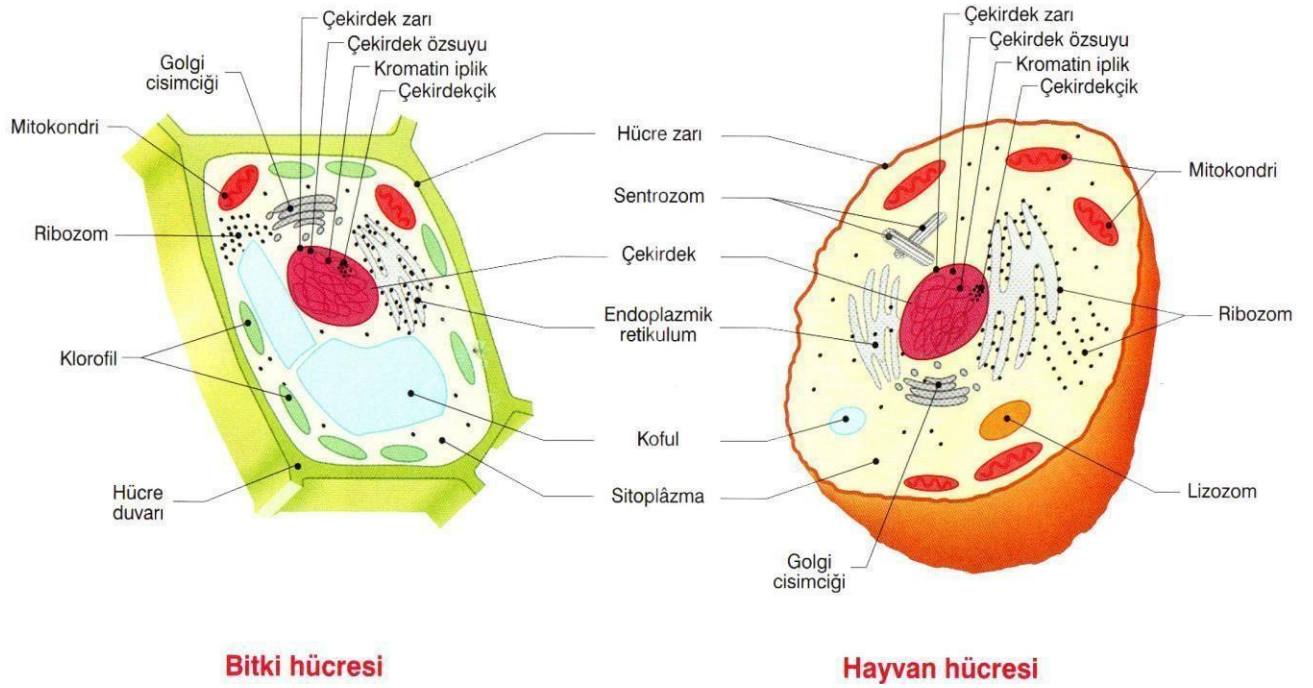
M.B:

İ.O:

ÇALIŞMA III: HÜCRE

Temel bilgi:

Biyolojinin en temel kavramlarından biri olan hücre, canlılığın yapısal ve işlevsel birimidir. Hücre kavramı, Robert Hooke' un (1635-1703) bir şişe mantarından aldığı kesiti mikroskopta inceleyerek gördüğü odacıklara “hücre” adını vermesiyle başlamıştır. Günümüzde ise iyice gelişmiş ve halen gelişmekte olan hücre bilimi, fen bilimlerinde olduğu kadar sağlık bilimlerinde de hastalıkların teşhisi, tedavisi gibi yaklaşımlarda en temel hedef haline gelmiştir. Hücreler genel olarak birbirlerine benzemelerine rağmen, prokaryot ve ökaryotlar arasında yapısal ve işlevsel farklılıklar vardır. Ayrıca ökaryotik canlılar olan bitki ve hayvan hücreleri arasında da bazı yapısal farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 1). Yapacağımız hücre çalışmalarında, hücrenin mikroskobik incelemesinin yanı sıra, bitki ve hayvan hücreleri arasındaki mikroskobik düzeyde görülebilecek farklılıklar da değerlendirilecektir.



Şekil 1: Bitki ve hayvan hücrelerinin karşılaştırılması

Çalışma III.I. Bitki hücresinin mikroskopta incelenmesi

Amaç: Soğan bitki hücresinin ışık mikroskobunda incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, beher, su, pastör pipeti, soğan, metilen mavisi, bistüri, kurutma kağıdı

Yöntem: Küçük parçalara ayrılmış soğan parçalarından bir yaprak alınız. Soğan yaprağının çukur tarafındaki zar tabakasını ayırınız. Temiz lamın üzerine 1-2 damla su damlatınız. Suyun üzerine soğan zarını koyunuz. Zar katlanırsa lamelin köşesiyle katlanan kısmı açınız. Lameli dikkatlice kapatınız. X4 / X5, X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz.

Çalışmanın ikinci aşamasında preparatınızı metilen mavisi ile boyayınız. Bunun için temiz bir lam alınız ve lamın üzerine 1-2 damla metilen mavisi damlatınız. Boyanın üzerine soğan zarını koyunuz. Lameli dikkatlice kapatınız. X10 ve X40 objektiflerde elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz.

M.B:

İ.O:

*

Sonuç ve Yorum:

M.B:

İ.O:

Çalışma III.II. Hayvan hücresinin mikroskopta incelenmesi

Amaç: Dil epitel hücresinin ışık mikroskopunda incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, beher, su, pastör pipeti, metilen mavisi, kurutma kağıdı

Yöntem: Laboratuvarında kolaylıkla incelenebilecek canlı hayvansal hücreye en iyi örnek dil epitel hücresidir. Lamın ortasına bir damla su damlatınız. Temiz bir lamel alınız. Lamelin bir kenarını, dilinize çok fazla bastırmadan, arkadan öne doğru çekiniz. Bu işlemi birkaç kez tekrarlayınız. Lamelin kenarındaki kazıntı materyalini suyun içinde dağıtınız. Bir damla metilen mavisi damlatarak dikkatlice lameli kapatınız. X4 / X5, X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X10 ve X40 objektiflerde elde ettiğiniz görüntüleri çiziniz. Bitki hücresi ile karşılaştırınız, farklılıkları belirtiniz

M.B:

İ.O:

*

Sonuç ve yorum:

M.B:

İ.O:

ÇALIŞMA IV. ÖZELLEŞMİŞ HÜCRELER

Temel Bilgi

Hücrelerin temel işlevleri aynı olmakla birlikte buldukları dokunun / organın özelliğine göre farklı işlevleri de vardır. Örneğin, bitkilerde kök, gövde, yaprak ve meyve hücreleri ve hayvanlarda kemik, kıkırdak, kas, deri vb gibi doku ve organlardaki hücreler işlevlerine göre farklı morfolojik ve fizyolojik yapıya sahiptirler. Laboratuvarında en kolay ve hızlı incelenebilecek özelleşmiş hücreler bitki hücreleridir. Bu nedenle çalışmalarımızda farklı işlevlere sahip bitkisel hücreler incelenecektir.

Çalışma IV.I. Patates nişasta depo hücrelerinin incelenmesi

Amaç: Patates nişasta depo hücrelerinin ışık mikroskopunda incelenmesi

Patates bitkisinin toprak altında kalan gövde kısmı özelleşerek nişasta deposu haline dönüşmüştür. Bu hücreler oldukça büyük ve şekilli parankima hücreleridir. Parankima hücreleri ve depoladıkları nişasta taneciklerini mikroskopta görmek mümkündür.

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, beher, su, pastör pipeti, lugol çözeltisi, kurutma kağıdı, patates, bistüri

Yöntem: Patatesi bistüri yardımıyla küçük parçalara ayırınız. Bu parçalardan ince kesitler alınız. Bu kesitleri lamın üzerine damlattığınız suya bırakınız, üzerine bir damla lugol çözeltisi koyunuz ve lameli kapatınız. X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X40 objektiflerde elde ettiğiniz görüntüyü çiziniz.

M.B:

İ.O:

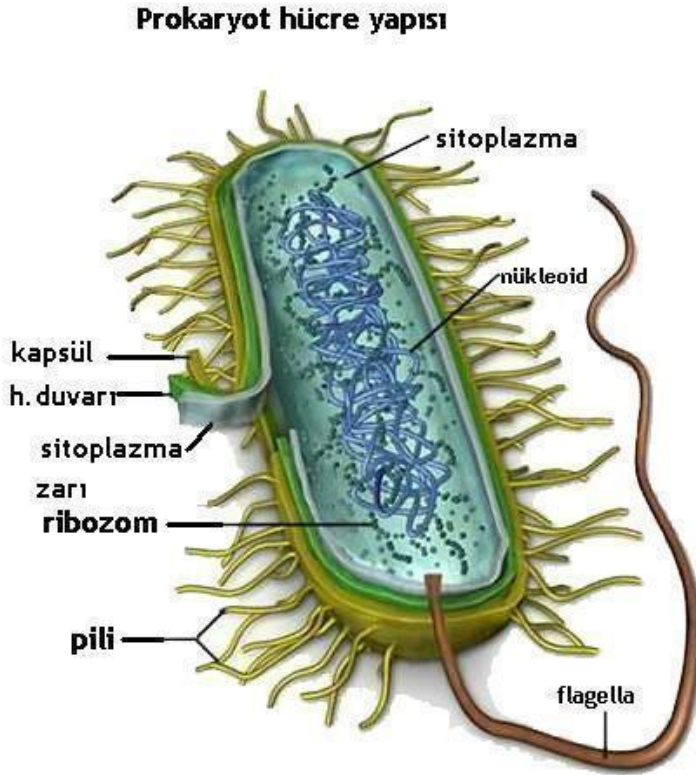
*

Sonuç ve yorum:

ÇALIŞMA V. BAKTERİLER

Temel Bilgi

Prokaryotik canlıların büyük bir kısmını bakteriler oluşturur (Şekil 2). Bugüne kadar milyonlarca bakteri türü tespit edilmiş ve halen de edilmeye devam etmektedir. Çok farklı yaşam koşullarında canlılıklarını sürdürebilir olmaları çeşitliliğin fazla olmasının nedenlerindedir. Bugüne kadar özelliklerine göre farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Ancak ışık mikroskobunda sadece şekillerine göre ayırt etmek mümkündür.



Şekil 2: Prokaryotik (bakteri) hücre yapısının şematik gösterimi

<http://www.biltek.tubitak.gov.tr>'den alınmıştır.

Çalışma V.I. Et suyu bakterileri

Amaç: Et suyu bakterilerinin ışık mikroskopunda incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, pastör pipeti, kurutma kağıdı, et suyu,

Yöntem: Bir hafta oda ısısında et suyunu bekletiniz. Lamın üzerine bir iki damla et suyu damlatınız. Lameli kapatınız. X4/X5 objektifte görüntü alanını bulduktan sonra X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X40 objektifte gördüklerinizi çiziniz ve yorumlayınız.

M.B:

İ.O:

*

Sonuç ve yorum:

Çalışma V.II. Yoğurt suyu bakterileri

Amaç: Yoğurt suyu bakterilerinin ışık mikroskopunda incelenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, pastör pipeti, kurutma kağıdı, yoğurt suyu,

Yöntem: Bir hafta oda ısısında yoğurt suyunu bekletiniz. Lamın üzerine bir iki damla yoğurt suyu damlatınız. Lameli kapatınız. X4/X5 objektifte görüntü alanını bulduktan sonra X10 ve X40 objektiflerde inceleyiniz. X40 objektifte gördüklerinizi çiziniz ve yorumlayınız.

M.B:

İ.O:

*

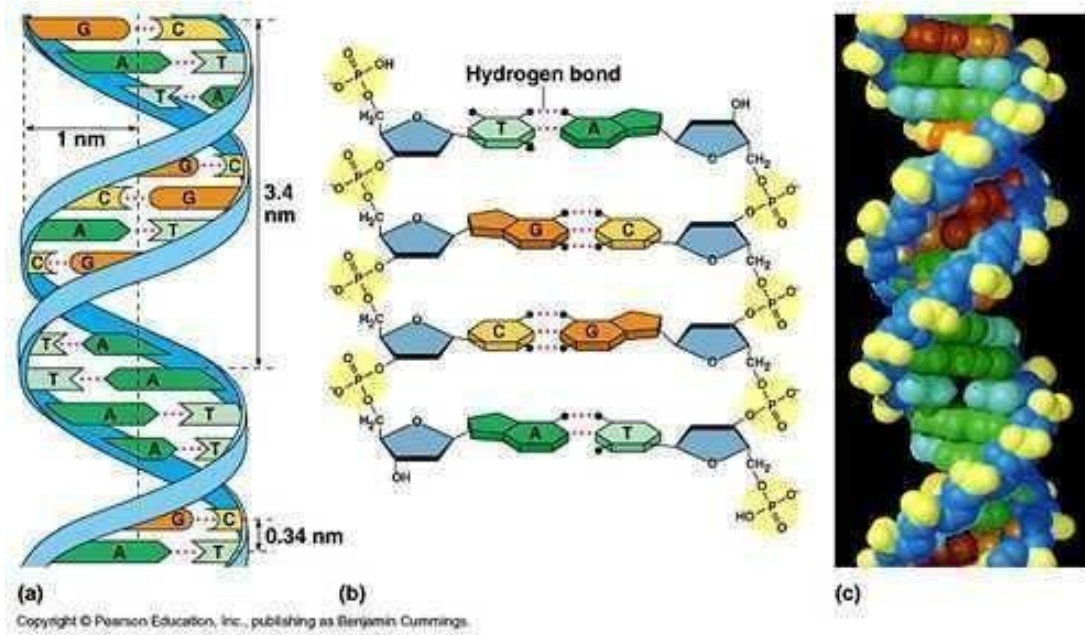
Sonuç ve yorum:

ÇALIŞMA VI. DNA İZOLASYONU

Temel Bilgi

Canlıların en temel özelliği, kendilerini çoğaltabilme yetenekleridir. Tüm organizmalar, kendi yapı ve işlevlerini belirleyecek genetik bilgiyi ebeveynlerinden kalıtlarlar. DNA (Deoksiribonükleik asit) bazı virüsler hariç tüm organizmalarda, genetik bilgiyi taşıyan moleküldür. DNA, 5 karbonlu şeker, bir fosfat grubu ve organik bir bazın (pürin veya pirimidin) oluşturduğu nükleotidlerden meydana gelir. Şeker ve fosfat arasındaki fosfodiester bağı ile nükleotidler birbirine 5'→3' yönünde bağlanırlar. Birbirine zıt yöndeki iki iplik nükleotidlerdeki bazların karşılıklı gelerek hidrojen bağı oluşturmasıyla birbirine bağlanır. Böylece dışta şeker-fosfat omurgası, içte hidrojen bağı ile birbirine bağlanan bazlar bulunur. Bazların bağlanması özgün olup daima bir pürin bir pirimidinle eşleşir (Pürinler, Adenin (A) ve Guanin (G); Pirimidinler ise, Timin (T) ve Sitozin (C) bazlarıdır) (Şekil 3).

DNA, hücre içerisinde serbest halde bulunmaz. Belli bir organizasyonu vardır. DNA' nın çok büyük bir kısmı çekirdekte, bir miktarı ise mitokondri ve bitkilerde kloroplastta bulunur. DNA molekülleri çekirdekte de serbest halde bulunmazlar. Histon olan ve olmayan proteinlerle organize olmuştur.



Şekil 3: DNA'nın moleküler yapısının şematik gösterimi

Bazı kimyasal maddeler ve enzimler ile canlı hücelere ait hücre zarı veya canlı hücre duvarının yıkılıp DNA'nın ortaya çıkarılmasına 'DNA izolasyonu' denir. Moleküler çalışmalarda öncelikle DNA' nın saf olarak, proteinlerden arındırılmış bir şekilde, elde edilmesi esastır. Farklı izolasyon yöntemleri olsa da genellikle 3 temel basamak bulunmaktadır.

- 1- Hücrenin parçalanması ve DNA' nın açığa çıkması
- 2- DNA' nın proteinlerden ayrılması ve çözünür duruma gelmesi
- 3- Protein, RNA ve diğer makromoleküllerden ayrılması

Öğrenci laboratuvarlarında uygulanabilecek kısa ve kolay metodlar ile DNA' nın eldesi mümkündür. Özellikle fazla araç ve gerece gerek duyulmadan yapılan bu yöntemde muz, soğan, bezelye gibi kolayca elde edilebilecek materyallerden biri kullanılabilir. Hayvansal hücreden DNA elde edilmesi isteniyorsa materyal olarak tavuk ciğeri, dana timus bezi, et ve yumurta (tavuk veya balık) kullanılabilir.

Çalışma VI.I. Muzdan DNA izolasyonu

Amaç: DNA'nın tuzda çöktürme yöntemiyle muzdan eldesi ve gözlenmesi

Araç ve gereçler: Beher (250 ml), beher (50 ml), mezur (100 ml), falkon tüp (15 ml), ependorf tüp, blender veya porselen havan, filtre veya gazlı bez, pastör pipeti, muz, deterjan, tuz, alkol (%96)

Yöntem:

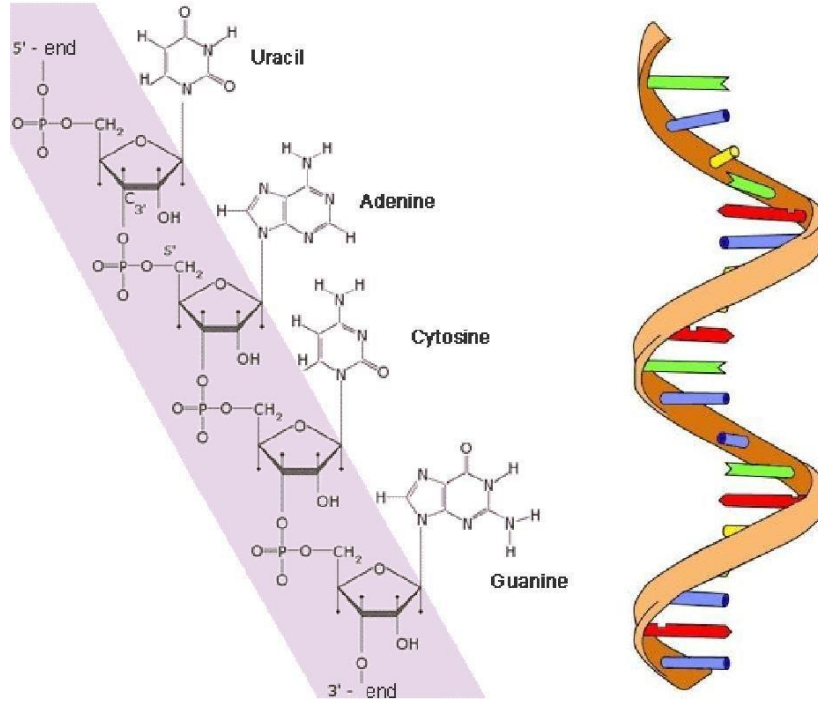
1. Bir adet muz 125 ml su ile iyice eziniz ve bulamaç haline getiriniz.
2. 50 ml beher içine;
2 çay kaşığı deterjan
1 çay kaşığı tuz
20 ml su koyunuz ve yavaşça köpürtmeden karıştırınız.
3. Deterjan karışımının üzerine 4 çay kaşığı muz bulamacı koyup 5-10 dk yavaşça, köpürtmeden karıştırınız.
4. Bu karışımı 50 ml' lik behere, filtreden ya da gazlı bezden geçirerek süzünüz.
5. Falkon tüpe soğuk 10 ml alkol (%96) koyunuz.
6. Alkolün üzerine süzdüğünüz sıvıdan 5 ml ilave ediniz.
7. 2-3 dk çalkalamadan bekleyiniz.
8. Beyaz bulut şeklinde DNA' yı gözleyiniz.
9. Ependorf tüpe yaklaşık 0.5-1 ml alkol koyunuz.
10. Falkon tüpdeki DNA' dan kürdan yardımıyla bir miktar alıp ependorf tüpdeki alkolün içine bırakınız

Sonuç ve Yorum:

ÇALIŞMA VII. RNA İZOLASYONU

Temel Bilgi

Protein sentezinde rol alan aynı zamanda bazı virüslerin genetik materyali olarak da görev yapan RNA, fosfodiester bağları ile bir arada tutulan ribonükleotid alt birimlerinden oluşan tek zincirli bir moleküldür. Her nükleotid alt birimi azotlu baz, halkasal yapıda beş karbonlu riboz şekeri ve fosfat grubu olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır. RNA yapısındaki azotlu bazlar adenin (A), guanin (G), sitozin (C) ve urasil (U)'dir (Şekil 4).



Şekil 4: RNA'nın moleküler yapısının şematik gösterimi

Gelişmiş yapılı canlılarda total RNA'nın toplam hücre ağırlığının %1,1 kadarını kapsadığı bilinmektedir. Örneğin tipik bir memeli hücresi 10-15 µg total RNA içerir. Ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde protein sentezi olaylarında farklı görevlere sahip üç temel tipte RNA bulunmaktadır.

1. Ribozomal RNA (rRNA): Ribozomların bütünleyici parçasıdır. rRNA, total hücresel RNA'nın yaklaşık %80'ini oluşturur. Bazıları (Örn 23S rRNA), katalitik aktiviteye sahip olan ribozimlerdir.
2. Transfer RNA (tRNA): Yaklaşık 73-95 nükleotid uzunluğunda olan tRNA, protein sentezi boyunca, peptid zincirine katılacak amino asitleri ribozomlara taşıyan moleküldür. Total hücresel RNA'nın %15'ini oluşturur.

3. Mesajcı RNA (mRNA): Proteindeki amino asit dizisini kodlar. DNA'dan proteinin sentezlendiği komplekse, bilgi taşıdığı için "mesajcı" (haberci) denir. Genellikle mRNA, total hücresel RNA'nın yalnızca %3'ünü oluşturur. Bu moleküller, en az kararlı hücresel ribonükleik asitlerdir.

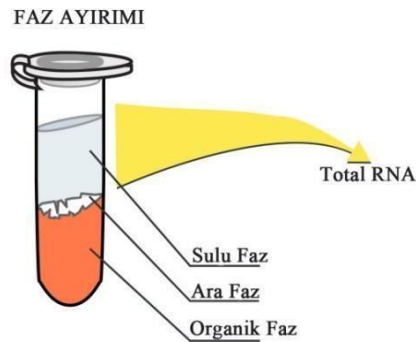
Bu temel tipteki RNA molekülleri haricinde değişik organizmalarda farklı görevlere sahip farklı RNA tipleri de bulunmaktadır. Örneğin çoğu ökaryotta bulunan mikroRNA (miRNA), hücrelerde gen düzenlenmesinde rol oynarken yine ökaryotlarda bulunan küçük nükleer RNA (snRNA) mRNA işlenmesine katılır.

Klonlama ve gen ifadesi analizi başta olmak üzere çoğu moleküler biyoloji çalışmalarının temel materyali olan ve sadece ifade edilen DNA dizisini içeren cDNA (komplementer DNA) eldesinin ilk aşaması herhangi bir hücre tipinden veya dokudan gerçekleştirilen parçalanmamış ve temiz bir total RNA izolasyonudur.

RNA izolasyonu farklı doku ve hücrelerden (kan, hücre kültürü, doku ve bakteri gibi) temel birkaç adımda elde edilebilir. Ancak elde edilecek dokunun özelliğine göre (lif ve proteince zengin dokular gibi) ek işlemler gerekebilir. Ayrıca RNA, RNazla çok kolay bir şekilde parçalanabildiğinden çalışmada, RNaz içermeyen (RNaz-free) solüsyonlar kullanılmalıdır. RNA ile çalışılırken çalışma ortamının temiz olmasına özellikle dikkat edilmeli; bu nedenle çalışma steril kabinde yapılmalı, buz üzerinde veya +4°C'de, steril ve filtrelili pipet uçları ile çalışılmalı, derideki RNaz'lar RNA'ların parçalanmasına neden olacağı için mutlaka eldiven kullanılmalıdır.

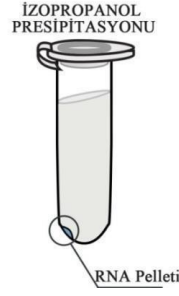
RNA izolasyonu temel olarak 5 basamaktan oluşmaktadır;

1. Homojenizasyon (Hücre çeperi ve membranın parçalanması)
2. Faz ayırımı (RNA'nın diğer makromoleküllerden ayrılması)



Şekil 5: RNA izolasyonunda oluşan fazların görünümü

3. Presipitasyon (İzopropil alkol ile RNA'nın çöktürülmesi)



Şekil 6: İzopropil alkol ile oluşan RNA çökeltesinin görünümü

4. RNA'nın yıkanması (%75'lik etil alkol ile RNA pelletinin birkaç kez yıkanması)
5. RNA'nın çözünmesi (RNA pelletinin kurduktan sonra 50-100 µl DEPC' li su ilave edilerek çözüldürülmesi ve çözünen RNA'nın -80°C'de saklanması)

Çalışma VII.I. Kandan RNA izolasyonu

Amaç: Kandan RNA eldesi ve gözlenmesi

Araç ve Gereçler: Falcon tüpü (15 ml), santrifüj, santrifüj tüpü, lizis buffer (4 M Guanidyum tiyosiyanat, 25 Mm Sodyum sitrat, %0,5 Sarkosil ve 0,1 M B-Merkaptoetanol), sodyum asetat, PBS (Fosfat Tampon Solüsyonu), asidik fenol, kloroform: izoamil alkol solüsyonu, izopropil alkol, %75'lik etanol, RNaz-free su

Yöntem:

Hücrelerin Lizisi:

- 1- 5 ml kan örneği alınır ve (0.5 ml 0.5 M EDTA, ph:8.0) EDTA içeren tüpe transfer edilir.
- 2- Esit hacimde fikolle kan tabakası yavaşça olusturulur ve 1000xg'de 20 dakika satrifüjlenir.
- 3- Lökosit tabakası dikkatlice alınır ve 1ml PBS ile yıkanır.
- 4- 6500 rpm'de 2 dakika mikrosantifüj uygulanır ve süpernatant atılır.
- 5- Hücrelerin üzerine 1000 µl lizis buffer ve 100 µl sodyum asetat eklenir.

Faz Ayırımı:

- 6- Tüp çalkalandıktan sonra 100 µl asidik fenol eklenir.
- 7- İyi karıştırılır ve 200 µl kloroform:izoamil alkol (49:1) karışımından eklenir.
- 8- 15 dakika buz üzerinde bekletilir ve 10000xg'de 20 dakika satrifüjlenir.

RNA Presipitasyonu:

- 9- Süpernatant alınır ve 1000 µl izopropil alkol eklenir. Sonra 30 dakika boyunca -20 C°de inkübe edilir.
- 10- 10000xg'de 20 dakika tekrar sentrifüjlenir. Sentrifüj sonrası RNA pelleti tüpün yüzeyinde beyaz bulutsu biçimde görünebilir.

Yıkama:

- 11- Supernatant dikkatlice uzaklaştırılır.
- 12- RNA molekülleri %75'lik alkolde tekrar suspense edilir.
- 13- Pipetör kullanılarak, tüpün alt kısmında kalan sıvı kısım dikkatlice uzaklaştırılır.

Yeniden Çözündürme:

23. Kalan etanolün uzaklaştırılması için 5-10 dk pellet kurumaya bırakılır.
24. Her bir örneğe 20 µl RNaz-free H₂O ilave edilerek RNA pelleti çözündürülür.
25. İzolasyon sonrası RNA miktarının tayini 2 saat içerisinde yapılmalıdır. Bu süre zarfında +4°C'de saklanabilir.

ÇALIŞMA VIII. NÜKLEİK ASİT ANALİZ YÖNTEMLERİ

Çalışma VIII.I. Spektrofotometrik Yöntem ile Nükleik Asit Kantitasyonu

Temel Bilgi

DNA'nın kantitasyonu DNA miktarının tayin edilmesidir. DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra izole edilen DNA'ların nanogram ya da mikrogram düzeyindeki miktarlarının tayininde absorpsiyon temeline dayanan spektrofotometrik yöntemler kullanılır. Spektrofotometrik ölçümde, bir çözeltideki çözünümlü konsantrasyonunu belirlemek için ışığın çözeltide iletilme oranı kullanılır. Cihaz, belirli bir dalga boyunda bir ışık hüzmelerinin bir örnekten geçtiği ve iletilen ışık enerjisi miktarının örneğin diğer tarafında bir fotosel ile ölçüldüğü basit bir ilkeyle çalışır. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon özelliği gösterir. Bu nedenle 260 nm'de ölçülen absorpsiyon değerleri (A_{260}) oldukça saf olarak elde edilen nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde kullanılır (Şekil 7 ve 8). Çift zincirli DNA molekülleri için 1 optik dansitenin (OD) 50 µg/ml'ye (RNA için 40 µg/ml) karşılık geldiği bilinmektedir. Buna göre çift zincirli DNA için miktar belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılır:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{sulandırım oranı}$$

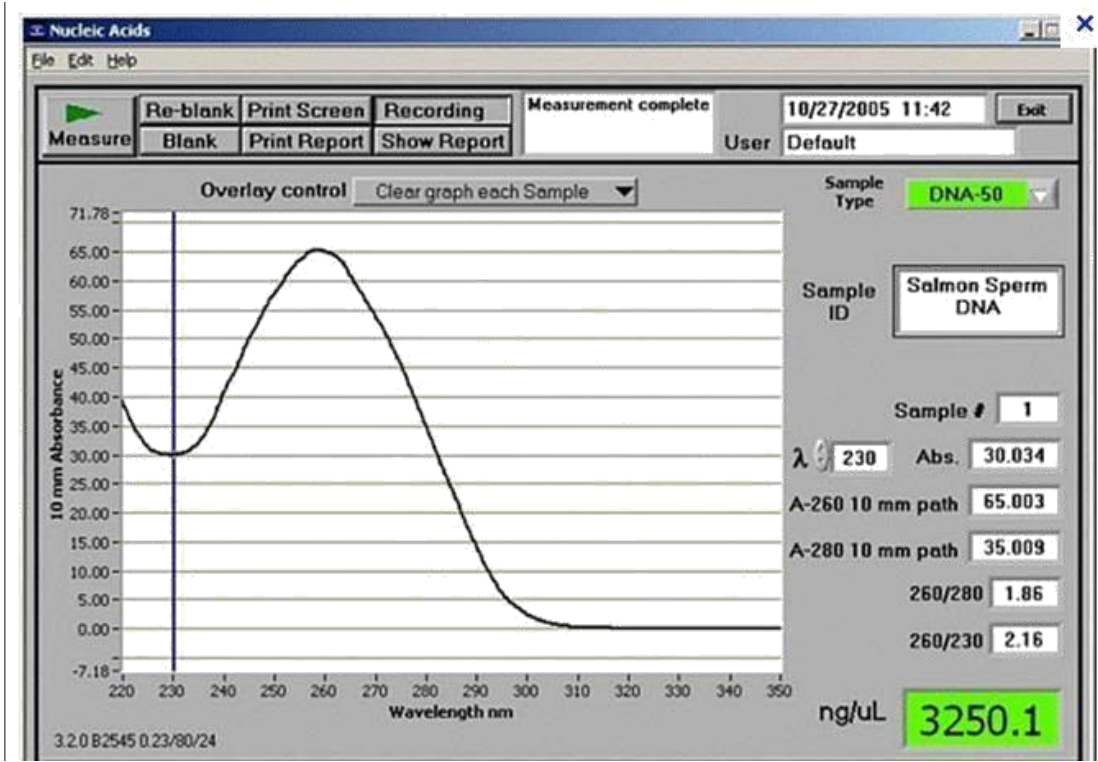
Kontaminatların varlığı, oran hesaplaması ile ayırt edilir. Proteinler ışığı 280 nm'de absorbladığı için A_{260}/A_{280} oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA yaklaşık 1.8, saf RNA ise yaklaşık 2.0 değerini vermelidir. 230 nm'de görülen absorpsiyon, karbohidratlar, peptidler, fenoller veya aromatik bileşenler gibi maddelerle kontaminasyonunu gösterir.

DNA saflığı

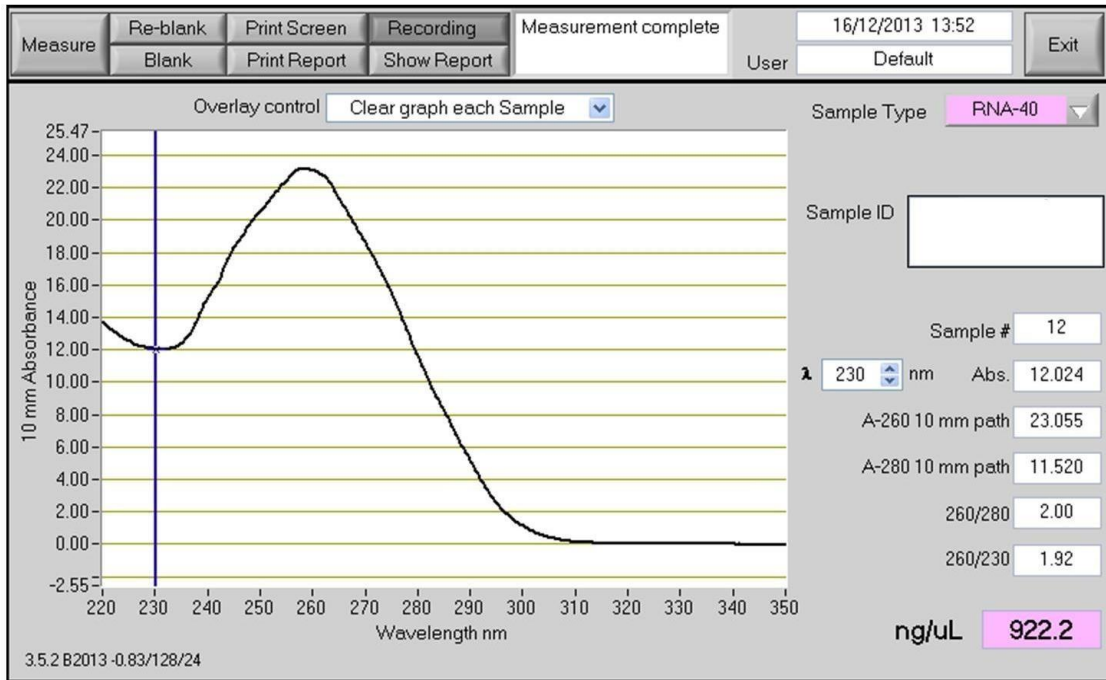
260/280=1.8 ise saf DNA
260/280>1.8 ise RNA kontaminasyonu
260/280< 1.8 ise protein kontaminasyonu

RNA saflığı

260/280 oranı; 1.8 ile 2.1 arasında ise saf RNA



Şekil 7: DNA'nın spektrofotometre analiz çıktısı

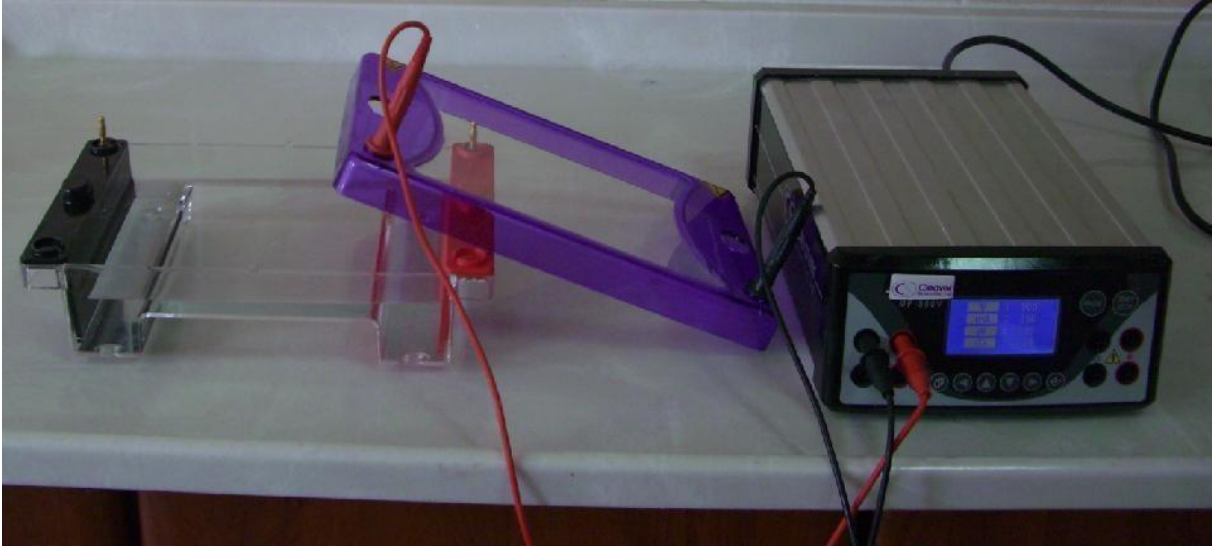


Şekil 8: RNA'nın spektrofotometre analiz çıktısı

Çalışma VIII.II. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi İle Nükleik Asit Analizi

Temel Bilgi

DNA moleküllerinin analizinde çok çeşitli yöntemler kullanılmakla birlikte laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan, basit ve hızlı olduğu için tercih edilen yöntem agaroz jel elektroferezidir (Resim 3). Elektroforetik analizinin temeli, DNA' nın elektriksel bir alanda agaroz jel üzerindeki göçüne dayanır. Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*' dan izole edilen doğrusal bir polisakarittir. Agarozun, sıcak suda çözünerek soğutulduğu zaman polimerleşerek jel yapısı oluşturma özelliği vardır. Bu özelliğinden yararlanılarak bir tampon içinde, farklı konsantrasyonlarda agaroz ilave edilerek ve ısıtılarak jel hazırlanır. Soğumaya bırakılan jel polimerleşir ve böylece agarozun konsantrasyonuna göre farklı büyüklükte porlar oluşur. Ayrıca DNA' nın jelde görünür hale gelebilmesi için jel soğumaya bırakıldığında, jele etidyum bromür eklenmesi gerekir. Etidyum bromür, DNA bağları arasına girerek 300 veya 360 nm' de ışığı absorblaması sonucu floresan etki göstererek DNA' yı jelde görünür hale getirme özelliğine sahiptir. Bu etki DNA konsantrasyonuna bağlı olarak kuvvetli veya zayıf olabilir. Etidyum bromür kanserojen bir madde olduğundan asla solunmamalıdır.



Resim 3. Agaroz jel elektroferez sistemi

Çalışma VIII.II. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi

Amaç: Agaroz Jel Elektroforez Tekniği İle DNA'nın Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

Araç ve gereçler: Yatay elektroforez, jel tepsisi ve tarak, güç kaynağı, otomatik pipet, pipet ucu, mikro dalga fırın, görüntüleme cihazı, koruyucu gözlük, erlenmayer, agaroz, ethidium bromür, tampon (1XTAE; Tris-Asetik asit-EDTA), yürütme boyası, molekül ağırlığı belirleyici (marker), DNA örneği.

Yöntem: % 1'lik agaroz jel hazırlayınız. Erlenmayerin içine 1 gr agarozu ve 100 ml 1XTAE tamponunu koyunuz. Mikrodalga fırında agaroz iyice çözünene kadar 3-4 dk kaynatınız. Bu arada jel tepsisini hazırlayınız. Temiz ve kuru tepsinin açık kenarlarını kapatıcı plastik ile kapatıp tarağı yerleştiriniz. Jel kaynadıktan sonra çeker ocakta 5-10 µl ethidium bromür ekleyiniz ve dikkatlice karıştırınız. Ethidium bromür kanserojen olduğu için bu işlemi mutlaka çeker ocakta yapınız, koruyucu gözlük ve maske takınız ve asla solumayınız. Biraz soğuduktan (50-60⁰C) sonra jeli hazırladığınız jel tepsisine yavaşça ve hava kabarcığı oluşturmadan dökünüz. 30-45 dk jelin polimerleşmesini bekleyiniz.

Jel polimerleştikten sonra jel tepsisinin kenarlarındaki plastikleri ve tarağı çıkarınız ve tepsiyi elektroforez tankına yerleştiriniz. Tarak çıktığında jelde oluşan kuyucukları gözleyiniz. Tanka, jelin

üstünü kapatacak kadar tampon doldurunuz. Kuyucuklara örnek DNA ve yürütme boyası karışımından (5-15 µl) koyunuz. İlk ve son kuyucuğa bilinen büyüklükteki moleküler belirleyiciyi koyunuz. Yükleme bitirdikten sonra tankın kapağını kapatınız. Güç kaynağından, volt, amper ve watt değerlerini ayarlayarak süreyi programlayınız ve yürütmeye başlayınız.

Yürütme tamamlandıktan sonra elektroforezi kapatınız. Jel tepsisini alınız. Ultraviyole görüntüleme cihazında jeli inceleyiniz. Gördüklerinizi değerlendiriniz.

Sonuç ve yorum:

ÇALIŞMA IX. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU VE RT-PCR

Çalışma IX.I. PZR

Temel Bilgi

Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase Chain Reaction - PCR*), *in vitro* koşullarda DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen özgün bir bölgenin enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır (Şekil 9).

1. DNA Zincirinin Açılması (Denaturasyon):

Kalıp DNA (template DNA), 94 °C - 98 °C’de 2-5 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır.

2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Bağlanma-Annealing):

Reaksiyon sıcaklığının, 45 °C - 65 °C’ye düşürülerek, oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir.

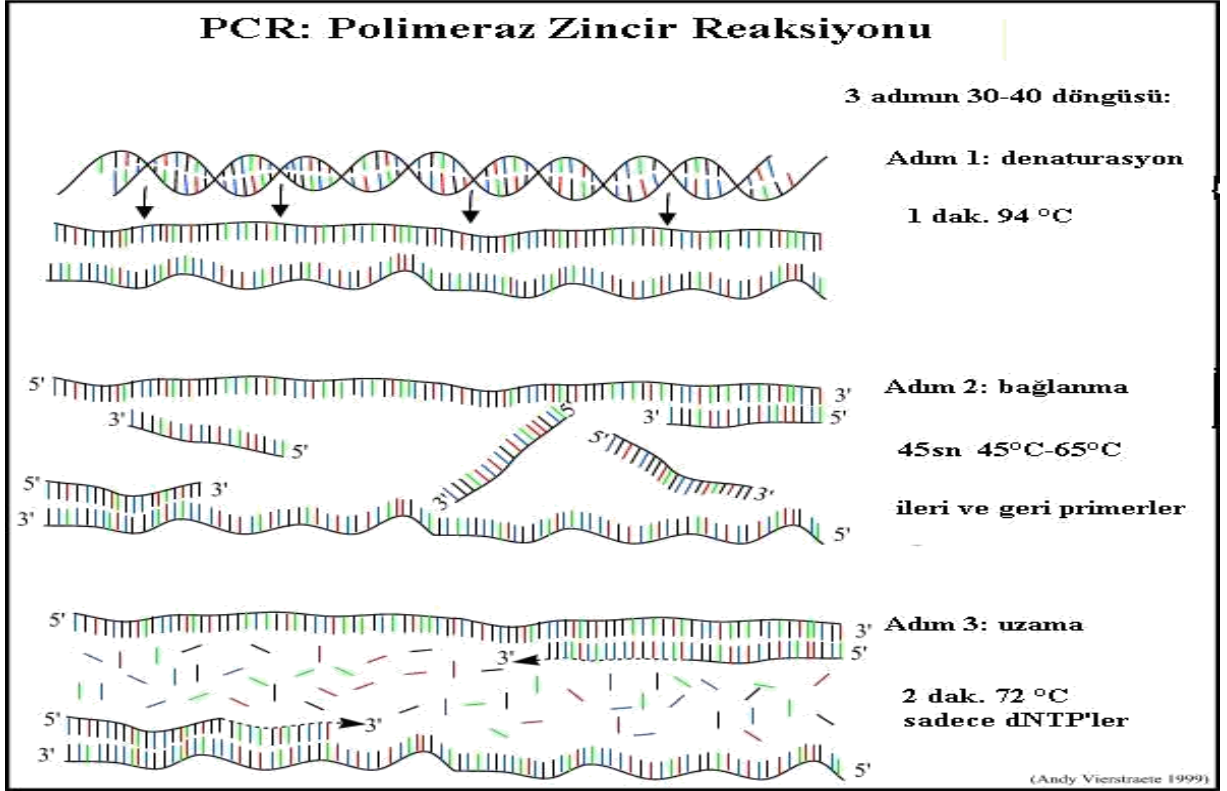
3. Primer Uzaması (Primer Extension):

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72°C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır.

PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır. Üç basamaktan (*denaturasyon, bağlanma, primer uzama*) oluşan işlem, bir PCR döngüsünü temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki hedef DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçası çoğaltılır.

PCR yönteminin gelişmesinde en büyük katkıyı Taq Polimeraz enziminin bulunması yapmıştır çünkü bu enzim yüksek sıcaklıklarda dahi dayanabilen bir enzimdir. Bu enzim ilk olarak Yellowstone milli parkında bir kaplıcada yaşayan termofilik bir bakteriden izole edilmiştir. Dr. Kary B. Mullis 1980’li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel ödülü almıştır.

PCR yaygın olarak tıbbi ve biyolojik araştırma laboratuvarlarında kalıtsal hastalıkların teşhisi, genetik parmak izlerinin tanımlanması, bulaşıcı hastalıkların teşhisi, genlerin klonlanması, babalık testi ve DNA dizilenmesi gibi değişik konularda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.



Şekil 9: PZR reaksiyonunun aşamaları

Bir PZR reaksiyonun temel bileşenleri şu şekildedir (Resim 4):

1. **Kalıp DNA:** çoğaltılması hedeflenen DNA dizisini içeren genetik materyaldir.
2. **Primerler (Oligonukleotidler):** 10-25 bç uzunluğundaki, DNA'nın PCR tekniği ile çoğaltılabilmesi için başlatıcı olarak iş gören sentetik oligonukleotidlere primer denir.
3. **DNA Polimeraz enzimi:** PCR reaksiyonunun katalizörü olarak iş gören ısıya dayanıklı ticari enzimlerdir. En çok kullanılan Taq polimeraz enzimidir.
4. **Magnezyum klorür (MgCl₂):** Taq DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Bu yüzden 0.5-2.5 mM arasında Mg iyonlarının dNTP konsantrasyonu içerisinde bulunması gerekmektedir
5. **Deoksinukleotid-Trifosfat (dNTPs) karışımı:** Nükleik asit ya da yeni DNA sarmallarının sentezlenebilmesi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP olarak bilinen 4 tip dNTP'nin reaksiyon karışımında eşit olarak bulunmasına ihtiyaç vardır. Bunlar reaksiyondaki fosfat grubunun da esas kaynağını oluştururlar.
6. **Tampon solusyonlar ve su (dH₂O) :**



Resim 4. PZR reaksiyonunun temel bileşenleri



Resim 5. PZR cihazı



Resim 5: PZR cihazında programlanmış bir PZR döngüsünün adımları

Çalışma IX.II. RT-PCR

Temel Bilgi

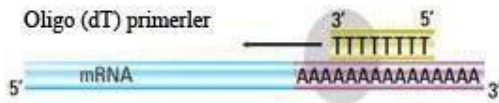
İzolasyon sonrası elde edilen RNA, çabuk parçalanabileceği için, komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilir. cDNA daha kararludur, sadece ifade edilen DNA dizisini içerir.

cDNA sentezinde, revers transkriptaz enzimi kullanılır. Sentezlenen cDNA; ekspresyon analizleri, klonlama çalışmaları ve cDNA kütüphanelerinin oluşturulması gibi alanlarda kullanılır.

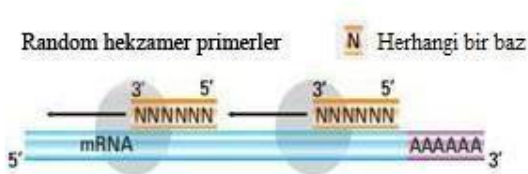
cDNA sentezi için gerekli temel bileşenler şu şekildedir:

1. Kalıp RNA: Revers transkriptaz enzimi, RNA bağımlı bir DNA polimeraz olduğundan diziyi bir RNA kalıbı olmadan sentezlemeye başlayamaz; bu nedenle cDNA sentezi için gerekli mRNA'yı içeren kalıp RNA kullanılır.

2. Primer: Revers transkriptaz enzimi, tıpkı DNA polimerazlar gibi sentezi başlatabilmek için bir primere ihtiyaç duyar. Deoksinükleotittrifosfatların (dNTP) varlığında, reverstranskriptazın zincir uzatmak için kullanacağı serbest bir 3'OH ucunun temini primer ile sağlanır. cDNA sentez reaksiyonlarında random heksamerprimerler veya oligo (dT) primerler kullanılabilir.



Oligo (dT) primerler: mRNA'nın poli (A) kuyruğuna komplementer ~18 baz içeren oligonükleotidlerdir.



Random heksamer primerler: 500 bç'den küçük mRNA fragmentlerinden cDNA sentezlemede kullanılan 6 baz içeren sentetik oligonükleotidlerdir.

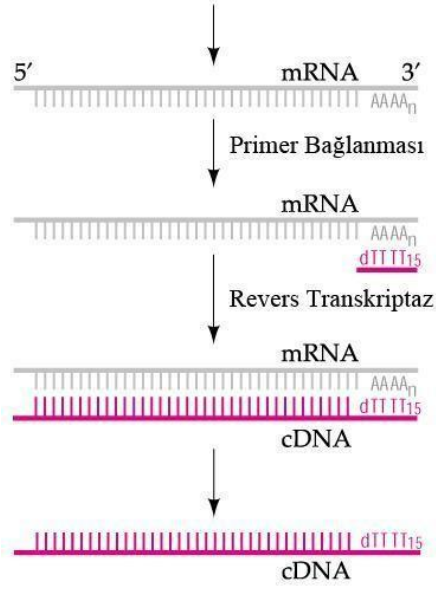
3. Revers transkriptaz: cDNA sentez reaksiyonunu gerçekleştiren ısıya dayanıklı ticari enzimlerdir.

4. dNTP karışımı: cDNA zincirinin sentezlenebilmesi için gerekli dATP, dTTP, dCTP ve dGTP olarak bilinen dört tip dNTP'yi içeren karışımdır.

5. RNaz içermeyen su ve reaksiyon tampon

cDNA sentez reaksiyon aşamaları:

1. Denatürasyon ve bağlanma: Su, RNA ve primer içeren tüp, RNA'nın sekonder yapısını denatüre etmek için 65-70°C'de 5 dk inkübe edilir. İnkübasyon sonrası buz üzerinde alınarak primerin RNA'ya bağlanması sağlanır.
2. Primer uzaması ve cDNA'ya çevirim: Tüpe, reaksiyonun diğer bileşenleri olan dNTP, revers transkriptaz enzimi ve tampon ilave edilir. Karışım 42°C'de 1 saat inkübasyona bırakılarak revers transkriptaz enzim aktivitesiyle primelerin uzaması için dNTP'lerin eklenmesi gerçekleşir ve böylece cDNA zinciri sentezlenmiş olur.
3. Reaksiyonun sonlanması: 1 saat sonrasında karışım, revers transkriptaz enziminin inaktivasyonu için 70°C'de 5 dk bekletilerek reaksiyon sonlandırılır.



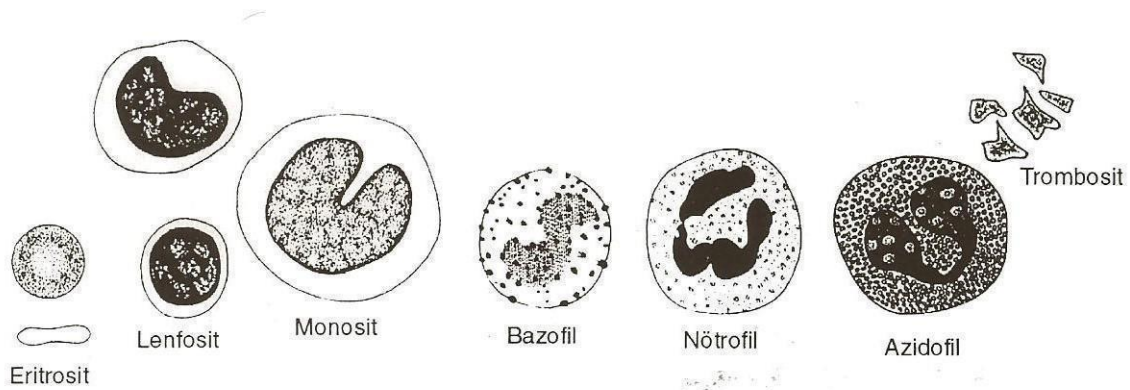
Şekil 10: cDNA sentez aşamaları

ÇALIŞMA X. KAN HÜCRELERİ VE Barr CİSİMCİĞİ

Temel Bilgi

Kan dokusu, plazma içinde yer alan serbest hücrelerden oluşan bir bağ doku tipidir. Ergin bir insanda ortalama 5-6 litre kan bulunur. Kan hücreleri, kan dokusunun %45'ini, plazma ise %55'ini oluşturur. Plazmanın %90-93'ü sudur, geri kalanı ise gaz, protein, aminoasit, yağ, şeker, hormon ve mineral tuzlar gibi diğer maddelerden oluşur. Kan hücreleri kanda oksijen taşınmasından antikor oluşumuna kadar pek çok farklı işlevi yürütür. Bu hücrelerin ömrü sınırlıdır ve organizmanın tüm yaşamı boyunca sürekli üretilirler. En önemli ortak özellikleri, tümünün köken aldıkları hücrenin aynı olması ve bu hücreden farklılaşarak oluşmalarıdır. Bu hücreye hematopoietik kök hücre ve kan hücrelerinin yapımına da hematopoezis denir.

Hematopoezis insan embriyosunun gelişiminin erken evrelerinde başlar, önce göbek kordonunda, sonra karaciğerde ve sonunda kemik iliği, dalak ve lenf düğümlerinde gerçekleşir. Kan hücreleri alyuvar (eritrosit), akyuvar (lökosit) ve kan pulcukları (trombosit) olmak üzere üç gruptur (Şekil 11).



Şekil 11: Kan Hücreleri

Eritrositler: Kan hücrelerinin yaklaşık %99 u alyuvardır, 1 mm^3 kanda ortalama 5 milyon alyuvar bulunur (Erkeklerde kandaki alyuvar oranı kadınlardan biraz daha yüksektir). İnsan eritrositlerinin çapı yaklaşık 7.5 mikrometredir. yetişkinlerde eritrositler özellikle kırmızı kemik iliğinde üretilirler. Kemik iliğinde üretildiği sırada çekirdeği bulunmasına rağmen, olgun eritrositlerde çekirdek ve organel bulunmaz. Bu nedenle ömürleri de kısadır (Ortalama 120 gün). Mitokondrileri olmadığından enerji ihtiyaçlarını oksijensiz solunumla karşılarlar.

Lökositler: Yabancı maddelere karşı koyan vücudun savunma sistemlerinin çekirdekli hücreleridirler. Normal bir yetişkinin kanının 1 mm^3 ünde 4-11 bin arasında akyuvar bulunur. Bu sayı yeni doğanda ve çocuklarda oldukça yüksektir. Ayrıca enfeksiyon sırasında akyuvar sayısı 25 bine kadar yükselebilmektedir. Bazıları alyuvarlar gibi kemik iliğinde bazıları da lenf düğümleri, dalak ve

bademcik gibi organlarda üretilir. Lökositler eritrositlerden daha büyük, az sayıda ve çekirdekli hücrelerdir. Ömürleri 2-4 gündür. Agranulositler ve granülositler olmak üzere iki büyük grupta incelenirler.

Agranulositler: Çekirdekleri tek parçalı ve sitoplazmasında granül bulunmayan lökositlere agranulosit denir. *Monosit* ve *lenfositler* olmak üzere iki grupturlar. En büyük lökositler olup çapları 20 mikrona kadar ulaşabilir. Monositler fagositoz yapan hareketli büyük hücreler olduklarından bu hücrelere Makrofaj da denir. Organizmaya giren yabancı madde ve bakterilere karşı fagositoz yoluyla bağışıklık cevabı oluşturulmasında rol oynarlar. Lenfositler en küçük lökositlerdir. 6-8 mikron çapındadırlar. Antikor ürettiklerinden bağışıklık sağlamada önemlidirler. T lenfositler ve B lenfositler olmak üzere farklılaşırlar.

Granülositler: Sitoplazmalarında pH'sı değişik boyalar ile boyanabilen granülleri vardır. Bu granüllerin boya kabul etme durumuna göre nötrofil, eosinofil (asidofil) ve bazofil ismini alırlar. *Nötrofillerin* sitoplazmaları asit veya bazik boyalarla boyanmaz. Çekirdekleri boğumlu, fagositoz ile savunma yapan, iltihabi olaylarda sayıları artan lökositlerdir.

Eozinofiller asit boyalarla pembeye boyanırlar, çekirdekleri genelde iki parçalıdır ve sayıları parazitik ve alerjik hastalıklarda artar. Nötrofiller gibi fagositoz yapabilirler ancak fagositoz yapma özellikleri zayıftır daha ziyade antijenleri zararsız hale getirirler.

Bazofiller bazik boyalarla maviye boyanırlar. Heparin ve histamin içeren bazofillerin çekirdekleri S harfi şeklindedir. Kanın pıhtılaşmasını önlemede ve lipid seviyesinin düşmesinde rol oynarlar.

Kan pulcukları (Plateletler, Trombositler): Kırmızı kemik iliğindeki megakaryositlerin parçalanmasından oluşan trombositler oval, yuvarlak ve yıldız şeklinde olabilen renksiz ve çekirdeksiz hücre parçalarıdır. Memeli olmayan omurgalılarda çekirdeği olan hücreler olmalarına rağmen memelilerde hücreden çok hücre parçası olduklarından platelet terimi daha uygundur. 1 mm^3 kanda ortalama 350 bin kadar bulunur. Nükleusları olmamasına rağmen metabolizmaları vardır. Ömürleri yaklaşık 5-12 gün kadardır. Salgıladıkları trombokinaz enzimi ile kanın pıhtılaşmasında rol oynarlar.

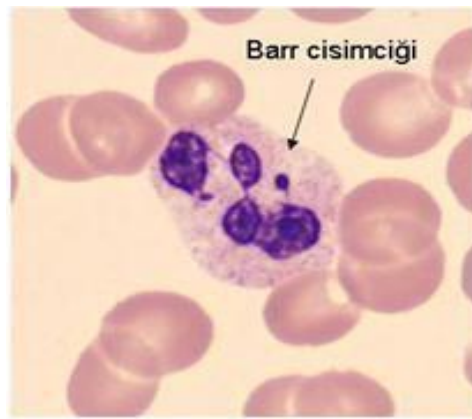
Barr Cisimciği (inaktif X kromatini): Memeli dişilerinin her bir somatik hücresi iki X kromozomuna sahiptir. Bunlardan biri anne (maternal), biri baba (paternal) orijindir.

Dişinin her somatik hücresinde bulunan iki X kromozomundan birinin rastgele inaktivasyonu dozu telafi etme olarak bilinir. Germinal hücrelerde (oositler) iki X kromozomu da aktif iken embriyolojik gelişmenin başlarında babadan yada anneden gelen kromozomlardan biri

rastgele inaktive olur. Hücrenin bundan sonraki kuşaklarında seçim rastgele değildir. İnsanda, inaktive olmuş X kromozomu, çekirdek zarfına komşu yerleşim gösteren bir heterokromatin kütleli olarak veya nötrofillerin % 1-10'ununda küçük bir **davul tokmağı** biçiminde gözlenen

(Resim 6) **Barr cisimciğinin** varlığıyla anlaşılır. Eğer bir hücrede ikiden fazla X kromozomu varsa bu ekstra X kromozomları inaktif hale gelir ve birden fazla Barr cisimciği izlenir. Barr cisimciği, kalıtsal olarak tamamen inaktiftir. Maskelenmiş şekilde beklemede olan bu işlevsiz

X-kromatini, ancak diğer X kromozomunun yapısı hasar gördüğünde aktif hale geçerek, onun yerini alır.



Resim 6: Nötrofil hücresinde Barr cisimciği

www.kanbilim.com'dan alınmıştır

Çalışma X.I. Kan yayma Preparatının Hazırlanması ve Kan Hücrelerinin İncelenmesi

Amaç: Kan hücrelerinin ışık mikroskobunda incelenmesi

Araç ve Gereçler: 2 adet temiz lam, Wright boyası, distile su, steril lanset, antiseptik solüsyon, pamuk

Yöntem: İki lamı sabunlu su ile iyice yıkayıp, duruladıktan sonra kurutunuz. Daha sonra alkolle silerek kurumasını bekleyiniz. Parmaklarınızdan birinin avuç içine bakan kısmını antiseptikli pamuk ile temizleyiniz. Steril kan lansetini parmağınıza batırınız ve temizlediğiniz lamın kenarına biraz kan damlatınız. Diğer temiz lamı 45° lik açıyla hemen kan damlasının önüne yerleştiriniz. Sonra lamı, açısını değiştirmeden alttaki lamın öbür ucuna doğru hızla çekiniz. Böylece geride ince bir kan tabakası yayılarak preparat (kan froti) hazırlanmış olur. Yayılmış kanı (smear) birkaç dakika bekleterek kurutunuz. Üzerine 15 damla Wright boyası uygulayınız ve 2 dakika bekleyiniz. Daha sonra distile su ile yıkayarak 2 dakika daha bekleyiniz. Bu sürenin sonunda lamı yan tutarak çeşme suyunda yıkayınız. Önce küçük, sonra büyük objektiflerde preparatınızı inceleyiniz. En çok görülen hücreler çekirdeksiz, oval portakal renkli eritrositlerdir. Lökositler Wright boyasının mavisini ya da kırmızısını aldığından hemen göze çarpar. Kan plateletleri (trombositler) daha koyu mavi ve küçük (yaklaşık 3µm) görülür.

Sonuç ve Yorum:

Çalışma X.II. Barr cisimciğinin (inaktif X kromozomu) gözlenmesi

Amaç: Nötrofillerin taranması yoluyla Barr cisimciğinin ışık mikroskobunda gözlenmesi

Araç ve Gereçler: 2 adet temiz lam, Wright boyası, distile su, steril lanset, antiseptik solüsyon, pamuk

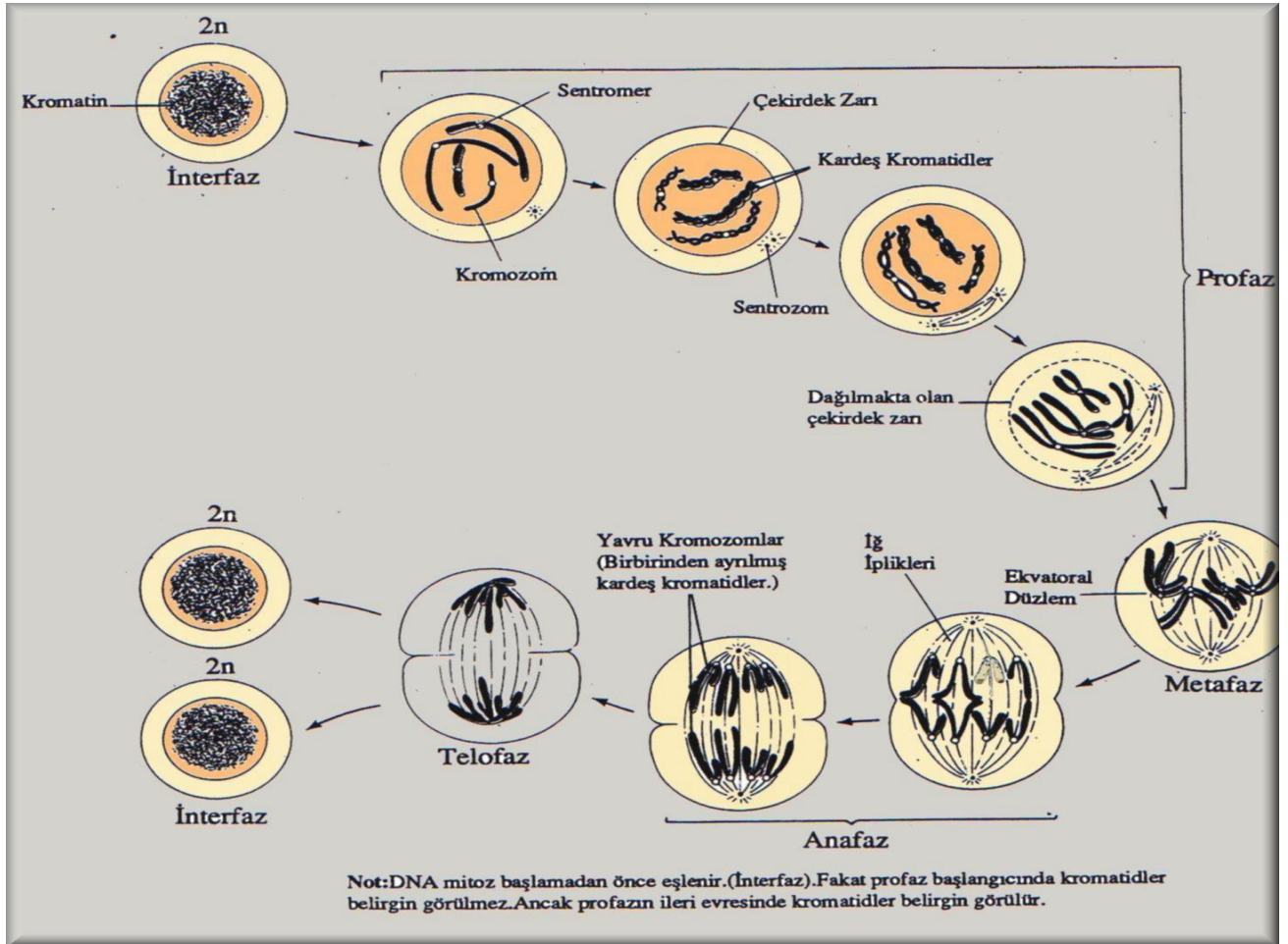
Yöntem: Çalışma X.I'de anlatıldığı şekilde hazırladığınız kan yayma preparatında özellikle nötrofil hücrelerini tarayarak nötrofillerin çok parçalı nukleuslarının ilişiğinde davul tokmağı şeklinde görülen Barr cisimciğini inceleyiniz.

Sonuç ve Yorum:

ÇALIŞMA XI. MİTOZ

Temel Bilgi

Mitoz, bir hücrenin kendisi ile özdeş iki yavru hücreye bölünmesidir. Mitotik bölünme, tüm embriyonik hücrelerde vardır ve daha sonra da dokuların oluşması, devamı ve onarımı için hızı azalarak devam eder. Çekirdeğin eşsiz bir özelliği, bölünen hücrelerin çoğunda, her bölünmede bileşenlerine ayrışması ve yeniden yapılanmasıdır. Mitozun başlangıcında kromozomlar yoğunlaşır, çekirdekçik kaybolur, çekirdek zarı yıkılır ve çekirdek içindeki materyalin büyük bir kısmı sitoplazmaya dağılır. Mitozun sonundaysa bu işlemlerin tersi gerçekleşir. Kromozomlar yoğunluğunu yitirir, çekirdek zarı ayrılan yavru kromozom setlerini birbirinden ayıracak şekilde yeniden oluşur. Mitozun temel süreci tüm ökaryotlarda korunmuş olup dört evreye ayrılmıştır; profaz, metafaz, anafaz ve telofaz (Şekil 12).



Şekil 12: Mitoz bölünmenin evreleri

Profaz: Kromozomların yoğunlaşmasıyla başlayan bu evrede çekirdekçik kaybolur, sentrozomlar kutuplara çekilir ve iğ iplikleri teşekkül eder. Sentromerlerinden birbirine bağlı iki kromatidden oluşan, kısalıp kalınlaşmış kromozomlar, kinetokor adı verilen özelleşmiş yapılar vasıtasıyla bu iğ ipliklerine tutunurlar. Profazın ilerleyen evresinde çekirdek zarı yıkılır.

Metafaz: İyice kısalıp kalınlaşmış kromozomlar, kinetokorlarından iğ ipliklerine tutunmuş vaziyette hücrenin ekvatoryal düzlemine dizilirler. Hücrelerin çoğu metafazda sadece kısa bir süre kalırlar.

Anafaz: Kromozomlar sentromerlerinden boylamasına ayrılırlar. Kromatidlerin her biri tutunduğu iğ iplikleri sayesinde zıt kutuplara çekilmeye başlar.

Telofaz: Kutuplara çekilen kromozomların yoğunluğu kaybolmaya başlar. Çekirdek yeniden oluşur. Geç anafazda başlayan sitokinez telofazın sonunda tamamlanır. Böylece ana hücrenin genetik yapısını taşıyan iki yavru hücre oluşumu tamamlanmış olur.

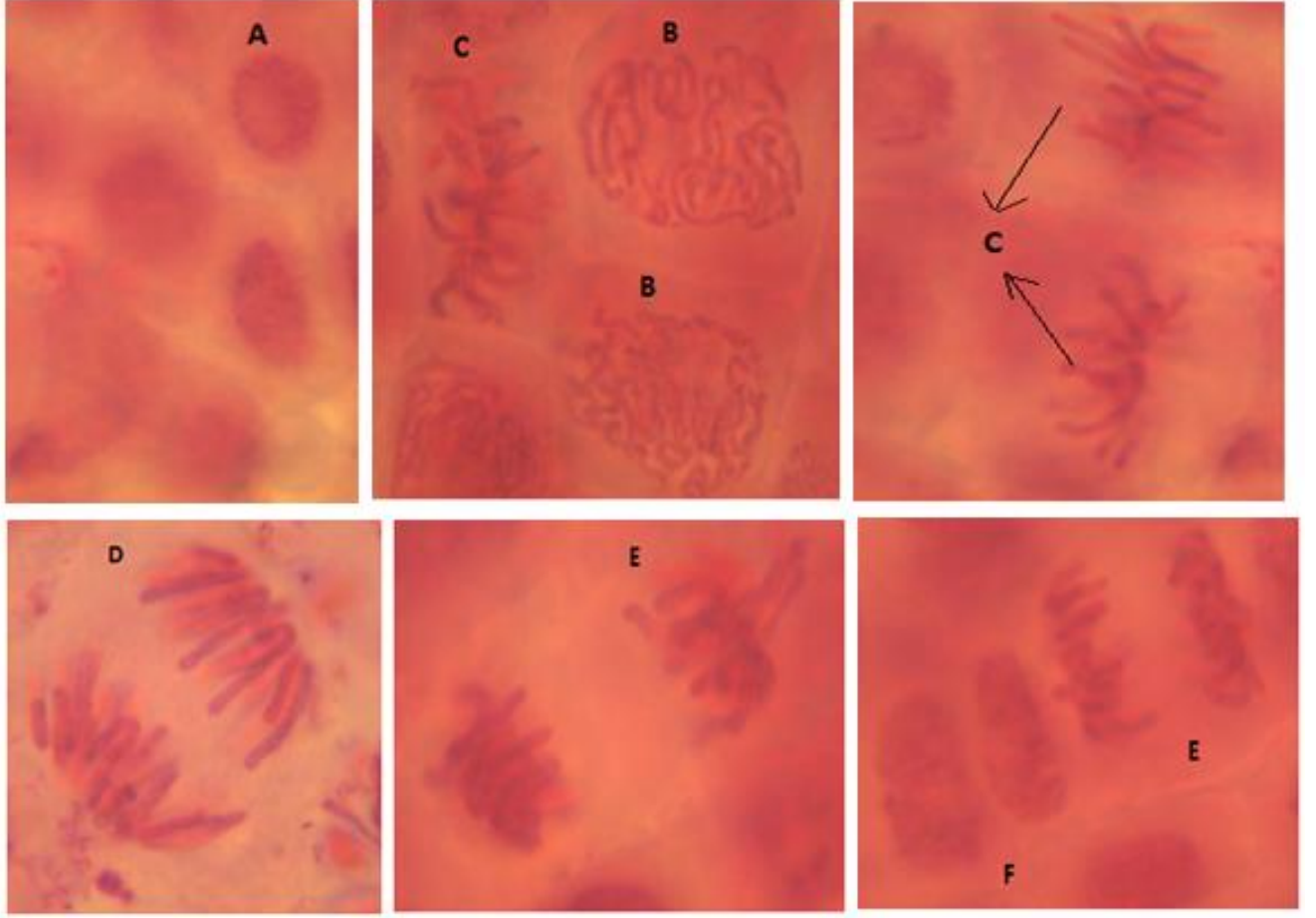
Laboratuvar ortamında kromozomları gözlemlemek için genellikle mitotik uyarıcı ile hücreleri bölünmeye sevk etmek ve bazı özel kimyasallarla metafaz aşamasında durdurmak gereklidir. Bu çalışmalar en azından bir hücre döngüsü kadar süre gerektirmektedir. Kısa sürede mitozun farklı evrelerini ve kromozomları görebilmek ise bölünme hızı yüksek olan bitki kök uçlarında mümkün olmaktadır (Resim 7).

Çalışma XI.I. Mitozun gözlenmesi

Amaç: Soğan bitkisinin çimlendirilmiş kök uçlarında mitozun gözlenmesi

Araç ve gereçler: Mikroskop, lam, lamel, beher, petri kabı, asetik asit, karmen boyası, filtre, pastör pipeti, kurutma kağıdı, soğan, pens, bistüri, bünzen beki

Yöntem: Aseto-karmen boyası hazırlayınız. Bunun için 100 ml %50 asetik asit ve 2 gr karmen boyasını beherin içerisinde yavaş yavaş ısıtarak 30 dk kaynatınız. İyice çalkalayınız ve soğuduktan sonra filtreden geçiriniz. 4-5 gün süre ile suda çimlendirdiğiniz soğan köklerinin ucundan 5-6 mm' lik parçalar keserek petri kabında toplayınız. Üstlerini örtecek şekilde aseto-karmen boyası koyunuz. Petri kabını bir maşa yardımıyla tutarak alevde yaklaşık 5 dk ısıtınız. Isıtılmış kök uçlarını soğuduktan sonra temiz bir pens yardımıyla lamın üzerine alınız. Üzerine 1-2 damla aseto-karmen boyası damlatılıp lameli kapatınız. Lameli sıkıca bastırarak kök uçlarının lam ve lamel arasında ezilmesini sağlayınız. Görüntü alanını X4/X5 objektifte bularak, sırasıyla X10, X40 ve X100 objektiflerde inceleyiniz. Mitozun evrelerini gözleyip X100 objektifte çiziminizi yapınız.



Resim 7: Soğan kök ucu hücrelerinin mitozun farklı safhalarındaki mikroskopik görünümü (MB: 10X100). A: İnterfaz, B: Profaz, C: Metafaz, D: Anafaz, E: Telofaz başı, F: Telofaz sonu

M.B:

İ.O:

Sonuç ve yorum: