



## Farklı Biyolojik Örnekler Geçirimli Elektron Mikroskop için Nasıl Hazırlanır?

İlknur Dağ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı, Uygulama ve Araştırma Merkezi (ARUM), Eskişehir/Türkiye

\*Sorumlu Yazar:  
E-posta: idag280@gmail.com

Geliş Tarihi : 01 Ekim 2018  
Kabul Tarihi: 23 Ekim 2018

### Özet

Geçirimli Elektron Mikroskopları (TEM) hücre biyolojisi alanında ve biyomedikal araştırmalarda çok önemli veriler sunan araçlardır. Yeni teknolojilerin de geliştirilmesiyle örneğin daha iyi görüntülenmesi sağlanmakta; böylece hem biyolojik örneğe ait bilgilerimiz artmakta hem de önemli moleküllerin yerleşimi hakkında detaylı verilere ulaşmamız mümkün olabilmektedir. Günümüze kadar pek çok mikroskop tipi geliştirilmesine rağmen, elektron mikroskoplarının en büyük avantajı çözünürlüklerinin çok yüksek olması ve hücre mimarisi hakkında çok detaylı bilgiler sunabilmesidir. Örneğin canlı haline en yakın biçimde görüntülenebilmesi için yapısal componentlerinin iyi korunmuş olması gerekir ve amaca uygun hazırlık protokülünün belirlenmesi ve uygulanması esastır. Bu derlemede biyolojik örneklerin TEM ile görüntülenebilmesi için en sık kullanılan teknikler hakkında genel bir bakış açısı sunulması hedeflenmiştir. Geleneksel metodların yanı sıra en yeni kullanılan kriyo tekniklere de değinilmiş ve her tekniğin avantaj, dezavantaj ve sunduğu bilgiler detaylandırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** geçirimli elektron mikroskopu, kriyo TEM

## How to Prepare Different Biological Samples for Transmission Electron Microscope?

### Abstract

Transmission electron microscopes are devices that introduce very important data in the field of cell biology and biomedical researches. With the developments new technologies, samples are visualized better. Thus, both our knowledges about biological sample increase and we can reach the detailed information about the location of important molecules. Although many types of microscopy developed to date, the most advantage of electron microscopes are the ability to give high resolution and the introduce very detailed information about cell architecture. To visualize sample in a state as close to a living state as possible, their structural components should be maintained and the determination and application of available preparation protocols is essential. This review aims to introduce an general point of view about the mostly used techniques about TEM imaging of biological samples. Both conventional and latest cryo techniques are defined, the advantages and disadvantages of each technique and introduced knowledges are detailed.

**Keywords:** transmission electron microscope, cryo TEM

## GİRİŞ

Geçirimli Elektron Mikroskoplar (TEM), hücrelerden makromoleküllere kadar çok çeşitli biyolojik örneklerin görüntülenmesi ve yapısal bilgi edinilmesini sağlayan araçlardır [1]. Bu sayede hücreler, dokular ya da virüsler gibi çok küçük organizmalar bile ultrayapısal düzeyde görüntülenebilmektedir [2]. Elde edilen verilerle,

- ▶ Hücre ve dokuların ince yapı araştırmaları,
- ▶ Bu örneklerdeki yapı ve fonksiyon ilişkilerinin değerlendirilmesi
- ▶ Hücre ve organellerin iki ve üç boyutlu yapılarının yüksek çözünürlüklü olarak elde edilmesi,
- ▶ Çeşitli doğal ve sentetik maddelerin, polimerlerin veya nanopartiküllerin morfolojik karakterizasyonu ile bunların hücre ile etkileşiminin görüntülenmesi mümkün olabilmektedir.

TEM ile ultrayapısal incelemelerin yanı sıra moleküler lokalizasyon, immünlokalizasyon, elektron tomografi ya da korelatif teknikler uygulanabilmekte ve bunların her biri için farklı ilave teknikler kullanılmaktadır [3]. Elde edilen bilginin çözünürlüğü örneğin özelliklerine, kullanılan hazırlık metoduna, elektron mikroskopunun teknik özelliklerine ve görüntüleme parametrelerine göre

değişiklikler göstermektedir. Günümüzde geliştirilen yeni teknolojiler sayesinde iki boyutlu elektron mikroskopu verileri işlenerek örneğin üç boyutlu yapısı hakkında bilgiler edinilebilmekte ve tek partikül analizi ya da helikal yapı hakkında da detaylı incelemeler yapılabilmektedir [1].

### Geçirimli Elektron Mikroskopu

Geçirimli elektron mikroskopta bir elektron tabancası ile oluşturulan elektronlar, mikroskop kolonunun yüksek vakumunda çok yüksek bir enerji ile hızlandırılırlar. Yüksek hızlı elektronlar manyetik alanlarla saptırıldığından dolayı, sistemde bulunan elektromanyetik mercekle elektronları yoğunlaştırır ve örneğin üzerine odaklarlar. Örnekten geçen elektronlar tespit edilir ve büyütülerek görüntülenen resimler kaydedilir [4]. Ancak yüksek vakum örnekler zarar verebilmekte ve biyolojik örnekler genellikle hafif elementlerden oluştuğundan elektronların oluşturacağı hasara karşı çok dayanıklı değildirler [5].

Biyolojik bir örneğin TEM ile incelemek üzere hazır hale getirilmesi oldukça komplike ve kritik aşamalardan oluşan uzun bir süreç gerektirmektedir. Örnekte incelenmek istenen bölgeye ve özelliklere göre bir hazırlık işlemi yapılmalıdır. Kullanılan teknikler geniş bir yelpazeyi kapsamaktadır ve temel takip aşamaları genellikle ortaktır

ancak, belirli bir örnek için izlenecek yol ya da kullanılacak kimyasallar değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin karaciğer ya da böbrek doku örneklerinin hazırlanma prosedürleri, virüs ya da polen örneklerine göre bazı farklılıklara sahip olmaktadır. Burada doku ya da hücrenin tipi, çalışılacak örneğin boyutu, örneğin elde ediliş şekli ve incelemenin hangi amaçla yapılacağı büyük bir önem taşımaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı, çalışma öncesinde örnekten elde etmek istediğimiz bilgiye göre kullanılacak metodlar arasından en iyi seçenek ya da seçeneklerin belirlenmesi esastır.

### Oda Sıcaklığı Koşullarında Örnek Hazırlanması

Biyolojik örneklerin çoğu yoğun bir örnek hazırlık aşaması gerektirmektedir. Bu, oldukça zaman alıcı bir süreçtir ve özellikle ultramikrotomda kesit alırken ideal incelikte örnek eldesi her zaman mümkün olamamakta ya da örneğin hazırlanması sırasında istenmeyen yapı değişiklikleri olabilmektedir. TEM ile inceleme sırasında sadece küçük bir alanın çalışılması tüm örnek hakkında net bilgi vermeyebilir. Bu sebeple çok fazla alanın taranması ve verilerin doğrulanması gerekmektedir.

İyi korunmuş bir örnek hazırlığı için en temel iki faktör örneğin uygun biçimde alınması ve uygun bir tespit solüsyonu ile fikse edilmesidir.

### Örneğin Alınması Tespiti Ve Rutin Takip İşlemleri

TEM ile çeşitli biyolojik örneklerin incelenmesi mümkündür. Cerrahi işlem ya da otopsi sırasında alınan örneklerden patolojik incelemeler yapılabildiği gibi, kültür edilmiş hücreler, bakteriler, virüsler, mantar ve bitkiler ya da diğer biyolojik organik materyaller TEM ile incelenebilmektedir. Örneğin elde edilmesi etik kuralları çerçevesinde yapılmalıdır. Mikroorganizmalar gibi etik düzenlemeler istemeyen örneklerde de prosedür yürütecek personel için olası sağlık riskleri gözönünde bulundurulmalıdır [2]. Çalışılacak örneğin boyutu, oryantasyonu ve örnekleme zamanı gibi faktörler de mutlaka dikkate alınmalıdır. Örneğin TEM incelemesi için doku parçalarının genellikle 1 mm<sup>3</sup>'den küçük olması istenir çünkü kullanılacak fiksatifin doku içine yeterince nüfuz etmesi gerekir [6]. Doku boyutunun büyük olması durumunda fiksatif örneği farklı derecelerde tespit edeceğinden örneğin yüzeyi iç kısımlarına göre daha çok fikse olur. Bu durumda dış kısım aşırı fiksasyondan dolayı zarar görürken, iç kısımlar zayıf penetrasyondan dolayı otoliz riski altındadır. Otoliz olayı hücrel ultrayapıyı yok ettiğinden dolayı yapısal detaylar korunamaz ve görüntü alınmaz. Bu sebeple eğer örnek parçaları büyükse uygun şekilde küçültülmelidir [2,7].

Örneğin alınması ya da küçültülmesi sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardan biri örneğin hangi kısımdan veri alınmak isteniyorsa o bölgenin doğru şekilde küçültülmesi ve prosedür boyunca korunmasıdır [2]. Örneğin periferik sinirin proksimal bölgesi çalışılacaksa dokunun küçültülmesi buna uygun olarak yapılmalıdır. Örnek alınması sırasında çok hızlı davranılmalı ve örnek hemen küçültülerek uygun fiksatif içine alınmalıdır. Beyin ya da spinal kord gibi bazı dokularda perfüzyon fiksasyonu önerilmekte ve henüz örnek alınmadan fiksasyon sağlanmaktadır.

Biyolojik örneklerin hazırlanmasında en kritik adım fiksasyon yani örneğin tespit aşamasıdır. Tespit işlemindeki amaç örneğin hücrel karakteristiklerini, komponentlerini

ve bunların dağılımını, şeklini ya da boyutunu koruyarak incelenebilmesini sağlamaktır. Fiksasyon işlemi ayrıca otoliz ve bakteriler tarafından bozulmayı önlerken, örnekte oluşabilecek hacim ve şekil bozukluklarını da baskılar. Dokuyu sertleştirdiğinden dolayı da takip eden işlemler sırasında oluşabilecek hasarları minimize eder. Diğer yandan örnekleri TEM ile inceleme sırasında elektron akımına karşı daha dayanıklı bir hale getirir [8].

Tespit işlemi iki şekilde yapılmaktadır:

1. Kimyasal Fiksasyon
2. Kriyo Fiksasyon

Kimyasal fiksasyon işlemi 1950'lerden beri kullanılmakta olup, belirli oranlardaki kimyasal bileşenlerin tek başına ya da kombine olarak örnek ile muamale edilmesine dayanır [7,9]. Bu işlem fiksatif ve dokunun kimyasal grupları arasında gerçekleşen reaksiyon sayesinde dokudaki harabiyeti önlemeye yarayan bir prosedir. Kimyasal fiksasyonun bazı sınırlamaları da bulunmaktadır: 1. Bazı doku komponentlerinin değişimi ya da yok olmasını engelleyemez; 2. Bu yöntemde doku komponentlerinin enzimatik aktivite ya da antijenite gibi bazı biyolojik karakteristikleri sıklıkla değişime uğramaktadır. 3. Doku komponentlerinin farklı derecelerde tespit olması, hücre ya da dokunun üç boyutlu yapılanmasında değişimlere yol açabilir.

Fiksatifler genel olarak dokuya iki şekilde verilmektedir. İmmersiyon fiksasyon olarak tanımlanan ilk metotta doku küçük parçalara ayrılarak fiksatif içine alınır ve doku tespit olana kadar beklenir. Diğer metotta ise fiksatif kan damarı içine verilerek dolaştırılır. Perfüzyon fiksasyon denilen bu yöntem, küçük laboratuvar hayvanlarıyla yapılan çalışmalarda ya da biyopsi sonrası hızlı lizise uğrayabilen dokularda tercih edilmektedir [8].

Uygun fiksatif seçiminde çalışmanın amacı, çalışılacak materyal, örnek boyutu ya da kullanım kolaylığı gibi faktörler gözönünde bulundurulmalıdır. Ayrıca tampon örneğin pH'sı ve ozmolaritesini korumak için uygun bir tampon içinde hazırlanmalıdır.

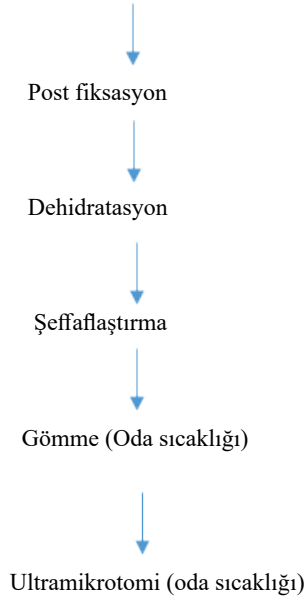
En yaygın olarak kullanılan fiksatiflerden biri 0.1 M fosfat tamponunda hazırlanan %2.5'lük glutaraldehit solüsyonudur. Diğer yandan fiksasyon süreci süresince hücreler öldüğünden, ortamdaki lizozom içeriği artar ve dokudaki pH asidik bir hale gelir. Bu da yapıdaki makromoleküllerin yıkımını hızlandırır. Bu sebeple ortamdaki optimal pH'nın korunması çok önemlidir. Çoğu hayvan hücresinin optimum pH'sı 7.4 olduğundan, fiksatif pH'sının 7.2 ya da 7.4 olması önerilmektedir [2].

Eğer farklı fiksatifler kullanılarak ardışık bir tespit işlemi yapılacaksa örnekler her bir fiksasyon işlemi sonrasında fiksatif hazırlanmasında kullanılan tampon solüsyonla yıkanmalıdır. Böylece fiksatifler arasındaki kimyasal reaksiyonlar önlenmiş olur. Temel uygulamada aldehit kullanılarak yapılan bir primer fiksasyon sonrası osmiyum kullanılarak sekonder bir fiksasyon yapılır. Yaygın olarak kullanılan tampon solüsyonlar ise fosfat ve kakodilat tamponlarıdır. Ancak çalışmanın amacına uygun olarak farklı tamponlarda kullanılabilir.

Farklı fiksatifler dokulara farklı hızlarda penetre olmaktadır. Genelde yüksek sıcaklıklarda penetrasyon oranı daha hızlıdır. Fiksasyon sıcaklığı 0°C ve 4 °C olacak şekilde düşük tutularak oda sıcaklığına göre daha uzun bir süre bekletilir. Fiksasyon süresi de örnek çeşidine göre değişmektedir. Kullanılacak fiksatif miktarı doku hacminin 20-50 katı kadar olmalı ve fiksasyon süresi dikkatle belirlenmelidir.

Primer fiksasyon için genellikle %2'lik glutaraldehit ya da %2'lik paraformaldehit kullanırken, sekonder fiksasyon için %1- %2'lik osmiyum tetroksit kullanılmaktadır. Osmiyum genel olarak hücre membranının ana elemanları olan yağları tespit eder. Elektron akımı altında çok güzel kontrast sağladığından postfiksasyon amacıyla kullanılmaktadır [10]. Ancak son derece toksiktir ve solunum yolu ya da deri içine absorbe olabildiğinden çok dikkatli çalışılmalıdır. Formaldehit protein, nükleik asitler ya da lipitlerle çapraz bağlanan bir aldehit grubudur. Dokuya daha derin ve daha hızlı penetre olur ancak nispeten zayıf bir fiksasyon gücü vardır ve oluşturduğu kontrast yetersizdir. Bu yüzden osmiyum ile postfikse edilmelidir. Glutaraldehit ise bir aldehit olup lipid ve polisakaritleri nispeten zayıf biçimde fikse eder. Hücre ve dokulardaki mikroyapının korunması için mükemmel bir fiksatiftir ancak aynı paraformaldehit gibi yeterli kontrast sağlayamaz ve dokuyu boyayamaz bu yüzden osmiyum tetroksit ile postfiksasyon gerektirir [2]. Biyolojik örnekler fiksasyon aşamasından sonra çeşitli proselerden geçirilmektedir. Kimyasal fiksasyon işleminde en yaygın olarak izlenen yol şu basamakları içermektedir:

Kimyasal fiksasyon (genelde +4 °C)



Primer fiksasyon sonrası yapılan sekonder fiksasyon işlemi ile tespit kalitesi artırılmaktadır. Dehidratasyon işleminde örnek içindeki suyun elimine edilmesi gerekir ve bu işleminde genel olarak alkol ya da aseton gibi organik bir çözücü, giderek artan konsantrasyon serileri şeklinde ve belirli sürelerde örnek ile muamele edilir. Sonrasında ise örnek suyla karışmayan epoksi tipinde bir resin içine gömülür. Sıcaklıkla polimerize olan örnekler blok haline getirilir ve elde edilen bloklar ultramikrotom ile kesit alınmaya uygun bir hale getirilir. Önce trim cihazı ile dokunun ucunu açmak için bir traşlama yapılır, daha sonra ise örneklerden 700 nm kalınlığında yarı ince kesitler alınır. Toluidin mavisi gibi bir boyayla boyanan alan ışık mikroskopunda tümüyle görüntülenebilmekte ve TEM için seçilecek alan buradan belirlenebilmektedir. Uygun bölge belirlendikten sonra ilgili bloktan tekrar bir trim işlemi yapılır ve 60 nm kalınlığındaki tam ince kesitler çalışmaya uygun olarak seçilen gridler üzerine alınır. Biyolojik örneklerin kontrastı düşük olduğundan gridler ağır metallerle (uranil asetat, kurşun sitrat) boyanarak kontrast artırılır ve kuruyan

gridler TEM ile incelenmeye hazır hale getirilir.

Pek çok biyolojik örneğin bu metod kullanılarak tespit edilmesi ve işlenebilmesi, bu prosenin özel bir ekipman gerektirmemesi ve laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilmesi, bloklar içine gömülen örneklerin yıllarca bu şekilde saklı tutulabilmesi bu yöntemin avantajları olarak sayılabilir. Diğer yandan bu yöntemin bazı yapısal artefaktların oluşabilmesi ya da ozmotik değişimler sebebiyle hücre hacim oranlarında çeşitli modifikasyonlar görülebilmesi gibi dezavantajları da olabilmektedir.

Kimyasal fiksasyon yöntemiyle hazırlanan bir biyolojik örnekte membran ve organel yapıları oldukça iyi tanımlanmış ve kontrastlı biçimde elde edilebilmektedir. Homojen bir fiksasyon işlemi yapıldığından örneğin geniş bir bölümünün incelenebilmesi mümkün olmaktadır. Bu proses, incelenen yapıya göre çeşitli modifikasyonların da yapılması ile ultrayapısal incelemelere, nanoaltın ya da kuantum dot teknikleri ile moleküler lokalizasyonların belirlenebilmesine, lektinler ya da kolloidal altın kullanılarak şeker residuellerinin tespit ve lokalizasyonlarının incelenmesine olanak tanımaktadır.

### Kriyo Elektron Mikroskopisi

Genelikle TEM incelemelerinde örneklerin maruz kaldığı çeşitli hasarlar ve olası zorluklara bir alternatif olarak 1974 yılında Robert M. Glaser ve arkadaşları sıvı nitrojen sıcaklıklarında dondurulan örneklerde, elektron hasarının dramatik biçimde azaldığını göstermişlerdir [11]. 1984'de Dubochet ve arkadaşları ise ilk kez bir virüs partikülünü sıvı nitrojen dondurma tekniği ile camı (vitröz) buz içine hapsedmişlerdir [12]. Bu sıcaklık derecesindeki vitröz buzun doymuş buhar basıncı, TEM içindeki vakum basıncından çok daha düşük olduğundan elektron kaynaklı hasarlar da çok daha az olmaktadır.

Kriyo elektron mikroskoplar örneklerin sıvı nitrojen sıcaklıklarında incelenebildiği cihazlardır. Biyoloji alanında kriyo-TEM uygulamaları çok geniş bir spektrumda kapsamakta ve giderek daha da popülerleşmektedir. Tam doku kesitlerinden, tek bir bakteri, virüs ya da protein molekülüne kadar çok çeşitli örnekler bu yöntemle incelenebilmektedir. Kriyo elektron tomografi, tek partikül analizi ya da elektron kristalografisi gibi alt disiplin alanlarında da biyolojik yapıların detaylı biçimde incelenebilmesi mümkün olmaktadır. Örneğin biyolojik bir numunenin farklı açılardan elde edilen büyütülmüş görüntüleri bir bilgisayar yardımıyla üç boyutlu hale getirilebilmekte ve örnek hakkında çok daha detaylı bilgilere sahip olunmaktadır. Bu metodlar tek başına kullanılabildiği gibi hibrid metodlar olarak da kullanılabilirlerdir.

### Kriyo Koşullarda Örnek Hazırlanması

Kriyo elektron mikroskopisi temel olarak iki araştırma alanını kapsamaktadır: 1. Örneğin ultrayapısal analizler ya da etiketleme çalışmaları için kriyo-korunmaya alınması, 2. Örneğin düşük sıcaklıklarda incelenebilmesi için bir kriyotabla kullanılarak cihaza alınması [13]. Pek çok örnek tipinde başlangıç fiksasyonu için hızlı soğutma metodu kullanılmaktadır. Proses sonrası ise örnekler uygun sıcaklıkta TEM'de incelenir. Günümüzde kullanılan pekçok kriyo hazırlama yöntemi vardır ancak hangi kriyo prosedürün seçileceği hususunda örneğin boyutları belirleyici bir rol oynamaktadır.

Eğer organ ya da doku parçaları gibi santimetre ya da milimetre boyutlarındaki büyük parçalar incelenecekse, örnek kriyoprotektan kullanılmadan korunamayacak ve buz kristali hasarı oluşacaktır. Bu sebeple örnek ya da doku yüzeyi direk olarak bir soğutucu içine alınır ve 10 µm kalınlığında ince bir tabakada koruma haline alınırlar. Süspansiyon içindeki hücreler gibi daha küçük boyutlu hücreler ise, iletken metal yapraklar arasına örneğin sıkıştırılmasıyla kriyoprotektan kullanılmadan korunabilmektedir. Burada örnekler yaklaşık -190 °C'de sıvı propan içine daldırılır. Buz kristali hasarı olmadan iyi biçimde korumanın kalınlık sınırı yaklaşık 10 µm'dır. Virüs partikülleri gibi küçük miktarlardaki örnekler böyle ince bir sulu film içinde etkili biçimde incelenebilmektedir [13].

Biyolojik örnekteki hücrel mimariyi koruyan en iyi metod günümüzde kriyofiksasyon olarak da bilinen yöntemdir. Bu işlemde örnek, hareket halindeyken çok hızlı biçimde ve kristal oluşturmaksızın dondurularak korumaya alınmış olur. Böylece örnek doğal halinde stabilize edilmiş olur. Yapılan hızlı dondurma işlemi sayesinde kimyasal fiksasyonda meydana gelen kimyasal reaksiyonlar baskılanmış olur. Ancak bu teknik özel ekipman kullanımını gerektirmektedir. Örneğin taşınması sırasında sıvı bir ajan içine daldırma, yüksek basınç kullanımı ya da önceden soğutulmuş metal bir bloğun üzerine alınma gibi farklı sistemler gerçekleştirilir. Burada biyolojik örneğin tipi büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde maksimum derinlikte (200 µm) kriyofiksasyona izin veren tek sistem yüksek basınçlı dondurma tekniğidir (High pressure freezings-HPF). Bu sistem 10.000 °C/s'den fazla bir oranda ve 2100 barlık bir basınçta örneğin dondurularak hücrel aktivitesinin durdurulmasını kapsamaktadır. Bu dondurma ve basınç oranında, su molekülleri hareket yeteneklerini kaybederler ve vitroz buz denilen bir hale dönerler [14]. Bu teknikle dondurulan örnekler daha sonra kriyo kesit alma, freeze fracture (dondurma kırma) ya da freeze substitution (dondurup yerine koyma) işlemleri uygulanabilir.

Ancak çoğu durumda örnekler kriyofiksasyon öncesi sükröz ya da gliserol gibi bir kriyoprotektan ile muamele edilmektedir [13]. Bu kriyoprotektanlar %10-30 konsantrasyonda kullanıldıklarında buz kristali oluşumu etkili bir biçimde geciktirilir ve yavaş donma olayı ile çok iyi bir yapısal korunma sağlanmış olur. Daha sonra ise bu örnekler yavaş ya da ılımlı soğutma oranları üreten çeşitli metodlarla dondurulmaktadır.

Kriyokoşullarda yapılan örnek hazırlama şekilleri incelenecek örnek ya da kullanılacak ekipmanlara göre büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin kimyasal fiksasyon sonrası sıcaklığın giderek düşürüldüğü ve sonrasında kriyo koşullarda gömmenin yapıldığı yöntemde moleküler lokalizasyonlar belirlenebilmektedir. Teknikte hassas bir aldehit fiksasyonu sonrası dehidrasyon yapılır ve sıcaklık +4°C'den -35°C'ye düşürülür. Böylece örnekteki komponentlerin kaybı azalır ve protein denatürasyonu minimize olur. Örnek -35 °C'de düşük viskoziteli ve suyla karışmayan bir akrilik resine gömülür [15]. Resinlerin çoğu hidrofiliktir ve polimerize olduklarında elektron akım stabiliteyi oldukça iyidir ve ultraviyole ışığı yardımıyla polimerize edilerek dokudaki antijenite korunmuş olur. Yöntem lokalize proteinleri belirlemek için kolay ve hızlıdır. Akrilik resin kullanıldığı için örnekte %5'lik bir su bulunmasına olanak tanır, kesitinin alınması zordur ancak hazırlanan blok yıllarca korunabilir. Ayrıca teknik ticari bir ekipman ya da el yapımı bir sistem kullanılmasını gerektirir.

Lokalize protein küçükse bu metodla sinyal elde etmek de zor olmaktadır. Osmiyum tetroksit kullanılmadığından örneğin elektron yoğunluğu fazla değildir ve hafif bir kontrastı vardır.

Tokuyasu metodu olarak bilinen yöntemde ise örneğin kriyokesiti alınır ve immünlokalizasyon teknikleri için kullanılır [16]. Bu metodda örneğin antijenitesini korumak için düşük konsantrasyonlu aldehitler kullanılır. Kimyasal olarak tespit edilen örnek jelatinle kaplanır ve sükrözle doyurulur. Sonrasında örnek özel bir tutucu üzerine yerleştirilir ve hemen sıvı nitrojenle dondurulur. Kriyoultramikrotom yardımıyla -80 °C ve -140 °C arası sıcaklıklarda örneğin kriyo kesitleri alınır (80-100 nm). Örnekler kontrastlanır ve metil selüloza gömülerek kurutulur. Bu teknikle örnekler dehidre edilmez ya da gömme yapılmaz; proteinler sulu bir surumda kalmış olur. İmmünlokalizasyon işlemi oldukça etkilidir ve küçük miktarlarda bulunan antijenler için çok faydalıdır. Çok hızlı olan bu yöntemde bir gün içinde sonuç alınabilir. Hücre içi membran sistemlerini çok net olarak ortaya koyar. Ancak düşük konsantrasyonda aldehit kullanılarak yapılan fiksasyon sonrası sükröz ile yapılan kriyokoruma, hücrel hacimde azalmaya ve çözünebilir proteinlerin kaybına yol açabilir. Kontrast ise genellikle düşüktür. Kriyokesitleme işlemi güçlüdür ve örnek sıvı nitrojen ile dondurulmak zorundadır. Bu yöntemde kontrast düşük olmasına rağmen, membranlar ve hücrel kompartmanlar çok net biçimde gözükebilmektedir. Özellikle moleküler lokalizasyon teknikleri için faydalı bir yöntemdir.

Kimyasal fiksasyon işleminin, fiksasyon sonrası yapılan işlemlere göre daha az değişim ve artefakt ürettiği bilinmektedir. Buradan yola çıkılarak geliştirilen diğer bir yöntemde örneğin kimyasal fiksasyonu sonrası bir kriyoprotektan kullanılır (genellikle sükröz) ve sonrasında kriyofiksasyon işlemi yapılır. Daha sonra örnek freeze substitution denilen ve -90 °C'de organik bir çözücü yardımıyla örnekteki suyun elimine edilmesini sağlayan bir işleme alınır. Burada genellikle sükrözle karışmadığından dolayı metanol kullanılmaktadır. Bu yöntem daha büyük örneklerin çalışılmasında idealdir ve homojen bir fiksasyon sağlamaktadır. Yönteme kimyasal fiksasyonla başlamak örnekte yapısal hasarlara yol açabilmektedir. Ticari bir ekipman ya da el yapımı bir sistem gerektirir. Ultrayapının oldukça iyi korunduğu bir yöntemdir. Hibrit metod olarak da bilinir [13].

Hibrit metod immünlokalizasyon çalışmaları içinde kullanılabilir. Örnekteki antijeniteyi korumak için düşük bir aldehit fiksasyonu yapılır ve sonrasında sükrözle kriyokoruma sağlanır. Metanol kullanılarak -90 °C'de freeze substitution (FS) yapılır. FS ortamına çeşitli fiksatifler eklenebilir. Sonrasında örneğin akrilik resine gömülebilmesi için sıcaklık artırılır [17]. Resine gömülü örnek UV ışığı ile polimerize edilir. Hücrel yapıları oldukça iyi koruyan bir yöntemdir ancak kesit alınması zordur. Kontrast oldukça düşüktür ve ticari bir ekipman ya da el yapımı bir sistem gerektirir. İmmünlokalizasyon çalışmaları için idealdir.

Yüksek basınçlı dondurma işlemiyle kriyofiksasyona alınan bir örnek buradan farklı şekillerde olabilen proseslere alınmaktadır. Bu proseslerden biri, farklı organik solventer yardımıyla freeze substitution işleminin gerçekleştirilmesidir [18]. Aseton, alkol ya da metanol gibi bir organik çözücü örnekteki suyun yerini alır ve bu da örneğin gömülmesine olanak tanır. FS ortamına belirli oranlarda kimyasal fiksatifler eklenebilir. Fiksatifin tipi örneğin çeşidime ya da çalışmanın amacına göre belirlenir. Isıtma süreci sırasında belirli sıcaklıklarda kimyasal fiksatifler de görevini yapar ve

örnekle etkileşime geçerler. FS yöntemi  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de çalıştığı için sıcaklık dereceli olarak artırılarak oda sıcaklığına geçirilir. Daha sonra örnek epoksi resine gömülerek kesit alma ve inceleme işlemleri yapılır. Bu yöntem hücresel mimarinin korunmasında en iyi yoldur. Proses süresi kimyasal metodlardan daha fazla değildir.ancak her örnek için kristal oluşumundan kaçınılarak çalışılmalıdır.

Kriyofiksasyon ile başlayan sürecin devamında in situ hibridizasyon ve immünlokalizasyon teknikleri gerçekleştirilebilir [19,20]. Proses yukarıda anlatılan proseslere benzer ancak organik çözücü olarak genellikle aseton kullanılır ve kullanılan kimyasal fiksatif tipi ve oranlarına çok dikkat edilmelidir. FS sonrasında örnek farklı sıcaklıklarda ve farklı akrilik resin tipleri kullanılarak gömülür ve son olarak UV ışığı ile polimerize edilir. Bu yöntem hem hücresel yapıyı hem de örneğin antijenitesini çok iyi koruyan bir yöntemdir. Bloklar yıllarca saklanabilir. Farklı tipte akrilik resinlerin kullanımına olanak sağlamaktadır. Ancak örneğin blok haline getirilmesi ve tüm örneğin belirli bir derecede oryantasyonu zor olmaktadır. Yöntem sayesinde moleküler lokalizasyon çalışmaları güzel sonuçlar sunmaktadır.

Yüksek basınçlı dondurma ve FS ile kriyofiks edilen bir örnek rehidre edilerek kriyokesitleme için Tokuyasu metoduna da uyarlanabilmektedir [21]. Bu yöntemde çok etkili bir immünlokalizasyon yöntemi ile kriyofiksasyonun sağladığı ultrayapısal koruma kombine edilmiş olmaktadır. Ancak kriyofiksasyonla başlayan örnek boyutları küçüktür ve rehidrasyon sırasında artefaktlar oluşabilmektedir. Tokuyasu metoduna benzer şekilde örnekten elde edilen görüntüde kontrast düşüktür ancak membranlar ve hücresel kompartmanlar çok iyi biçimde görülebilir. Kimyasal yolla tespit edilmesi zor olabilen örneklerin moleküler lokalizasyonlarını saptamada spesifik bir tekniktir.

Tüm bu yöntemlerin yanısıra, kriyofiks edilen bir örnekle başlayan süreç diğer başka tekniklerle de devam ettirilebilir:

**Dondurma-kırma metodu:** Bu yöntemde örneğin dondurularak kırılması ve çift taraflı bir kırık elde edilmesi, farklı açılarda platinum-karbon kullanılarak bu taraflardan bir kopyanın elde edilmesi ve mikroskop altında incelenmesi sağlanır [22].

**Dondurma-kurutma yöntemi:** Bu teknikte kriyofiks edilen örnekten daha sonra suyun çıkarılması sağlanır. Bu işlem vakum altında ve düşük sıcaklıklarda sublimleşme için yapılır. Örnek kurutulduktan sonra resine gömülür ve kesilir [23].

**Cemovis:** Yüksek basınçta örneğin dondurulması, kesilmesi ve direk olarak kriyoinceleme yapılmasıdır. Bu yöntemde örnekten suyun uzaklaştırılmasına gerek olmadan inceleme yapılabilir ve biyolojik örneğin en doğal hali gözlenmiş olur [24].

Geçirilmiş elektron mikroskopi hücre ve dokuların nasıl çalıştığını anlamamızda esas olan araçlardır. Böylece bu yapıları yüksek çözünürlükle inceleyebilir, yapıda bulunan komponentleri ve fonksiyonlarını daha iyi anlayabiliriz. Ayrıca çeşitli biomarker ya da antijenik yapıların lokalizasyonlarını da belirleyebiliriz. Ancak mikroskopi öncesi örneğin uygun şekilde hazırlanması hem yapısal komponentlerin korunması ve hem de örneğin doğal haline en yakın biçimde kalması açısından son derece önemlidir. Çok farklı teknikler olmasına ve sürekli de yeni teknolojiler

geliştirilmesine rağmen bu tekniklerin farklılıkları ve elde etmek istediğimiz bilgiye göre seçimi çok dikkatli biçimde yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- [1] Thompson, R.F., Walker, M., Siebert, C.A., Muench, S.P., Ranson, NA. (2016) An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. *Methods* 100, 3-15.
- [2] Park, C.H., Kim, H.W., Uhm, C.S. (2016) How to Get Well-Preserved Samples for Transmission Electron Microscopy. *Applied Microscopy* 46,188-192.
- [3] Frankl, A., Mari, M., Reggiori, F. (2015) Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbil Cell* 2, 412-428.
- [4] Wang, H. (2015) Cryo-electron microscopy for structural biology: current status and future perspectives. *Science China Life Sciences* 58, 750-756.
- [5] Taylor, K.A., Glaeser, R.M. (2008) Retrospective on the early development of cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on the opportunities for the future. *Journal of Structural Biology* 163, 214-223.
- [6] Uhm, C.S., Park, E.K., Park, C.H. (1998) Tissue preparation with t-Butyl alcohol freeze-drying method for scanning electron microscopy: application for rat liver. *Korean Journal of Electron Microscopy* 28, 299-306.
- [7] Hayat, M.A. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. 1989 CRC Press, Boca Raton, FL.
- [8] Wisse, E., Braet, F., Duimel, H., Vreuls, C., Koek, G., Steven, W.M., Damink, O., Broek, M.A.J., Geest, B.D., Dejong, C.H.C., Tateno, C., Frederik, P. (2010) Fixation methods for electron microscopy of human and other liver. *The World Journal of Gastroenterology* 16, 2851-2866.
- [9] Mascorro, J.A., Bozzola, J.J. (2007) Processing Biological Tissues for Ultrastructural Study. In: Kuo J. (eds) *Electron Microscopy Methods in Molecular Biology™ Humana Press* 369, 19-34.
- [10] Bozola, J.J., Russell, L.D. (1992) *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. second edition. John and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, USA.
- [11] Taylor, K.A., Glaeser, R.M. (1974) Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science* 186, 1036-37.
- [12] Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., McDowell, A.W. (1984) Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308, 32-36.
- [13] Costello, M.J. (2006) Cryo-electron microscopy of biological samples..*Ultrastructural Pathology* 30,361-71.
- [14] Studer, D., Graber, W., Al-Amoudi, A., Egli, P.A. (2001) A new approach for cryofixation by high-pressure freezing. *Journal of Microscopy* 203, 285-294
- [15] Carlemalm, E., Garavito, M., Villiger, W. (1982) Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *Journal of Microscopy* 126, 123-143.
- [16] Tokuyasu, K.T. (1973) A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *Journal of Cell Biology* 57, 551-565.
- [17] Mobius, W. (2009) Cryopreparation of biological specimens for immunoelectron microscopy. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*,191,231-247
- [18] Terracio, L., Schwabe, K.G. (1981) Freezing and

drying of biological tissue for electron microscopy. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 29, 1021–8.

[19] Giddings, T.H. (2003) Freeze-substitution protocols for improved visualization of membranes in high-pressure frozen samples. *Journal of Microscopy* 212, 53-61

[20] McDonald, K.L. (2009) A review of high-pressure freezing preparation techniques for correlative light and electron microscopy of the same cells and tissues. *Journal of microscopy* 235, 273–281.

[21] Ripper, D., Schwarz, H., Stierhof, Y.D. (2008) Cryo-section immunolabelling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration. *Biology of the Cell* 100, 109-123.

[22] Cavalier, A., Spohner, D., Humbel, B.M. (2009) *Handbook of Cryo-Preparation Methods for Electron Microscopy*. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, FL.

[23] Edelmann, L. (2002) Freeze-dried and resin-embedded biological material is well suited for ultrastructure research. *Journal of Microscopy* 207, 5–26.

[24] Al-Amoudi, A.I., Chang, J.J., Leforestier, A., McDowall, A., Salamin, L.M., Norlén, L.P., Richter, K., Blanc, N.S., Studer, D., Dubochet, J. (2004) Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO Journal* 23, 3583-3588.