

HÜCRE İNCELEME METOTLARI

Prof. Dr. Serkan Yılmaz

Hücre İnceleme Metodları

Hücreler çok küçük ve oldukça karmaşık yapılardır. Özellikle çok hücreli organizmalar farklı görevleri yerine getirebilmek için birbirlerinden farklı yapılar sergiler. Hücrenin yapısını ve moleküler kompozisyonlarını incelemek, farklı bileşenlerin fonksiyonlarını anlamak çok zordur. Bu nedenle çok değişik inceleme teknikleri geliştirilmiş olup bu tekniklere her gün yenileri ilave olmaktadır.

Hücreyi inceleme tekniklerini iki başlık altında toplayabiliriz:

1. Hücreyi bir bütün olarak inceleyen teknikler
2. Hücre bileşenlerinin analizi için kullanılan teknikler.

Hücreyi Bir Bütün Olarak İnceleyen Teknikler

Gerek farklı yapıdaki hücreleri, gerekse hücrelerin farklı kısımlarının özelliklerini tam bir hücre halinde incelemek için kullanılan teknikleri üç gruba ayırabiliriz:

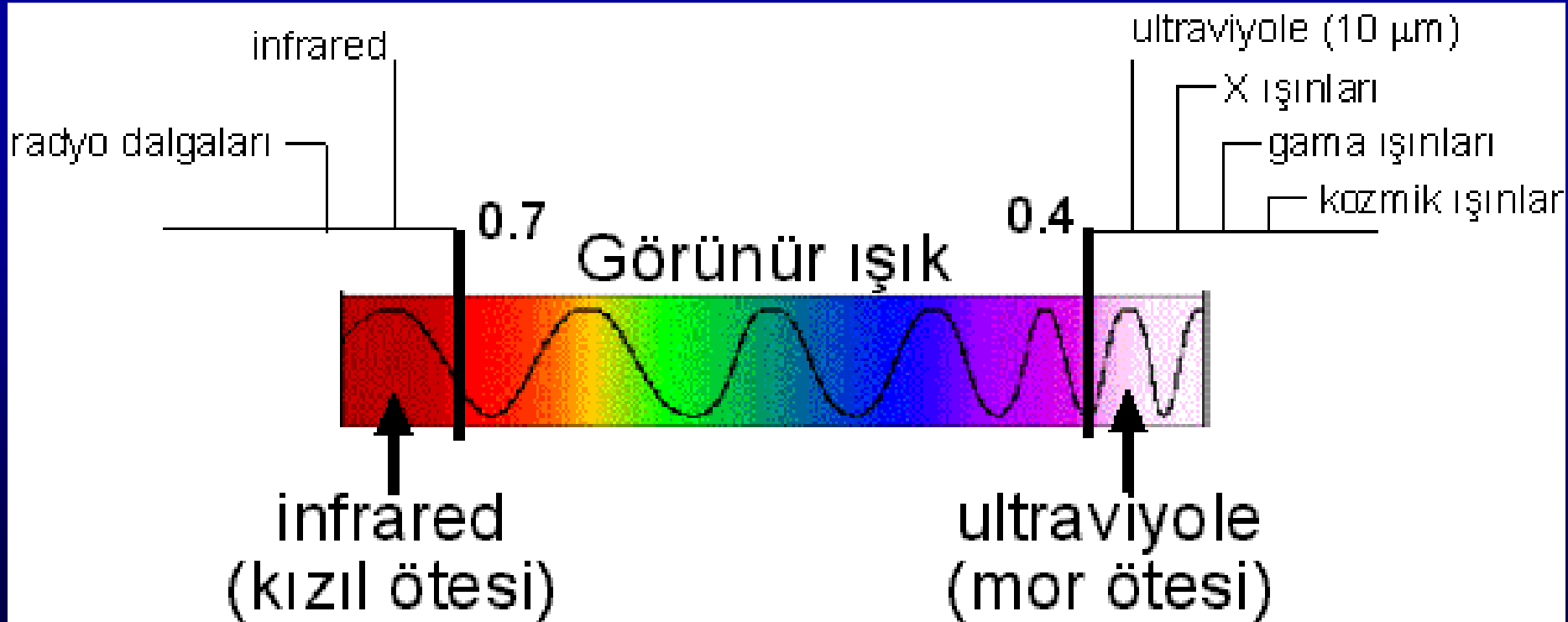
1. Tesbit (fiksasyon) ile inceleme
2. Canlı (Vital) inceleme
3. Hücre kültürleri

Tesbit (Fiksasyon) İle İnceleme

Canlı hücrelerin farklı bölgelerinin ışığı kırmaları birbirine yakın olduğundan bu halleri ile mikroskopta incelenmeleri zordur. Hücrenin sahip olduğu ayrıntıların daha iyi gözlenebilmesi için hücrenin **tesbit edilmesi (fikse edilmesi)** ve bundan sonra değişik boyalarla boyanması gerekir. Ancak bu boyamadan sonra bu hücreleri mikroskopla incelemek mümkün olmaktadır. Tesbit edilip boyanmış hücreleri incelemek için günümüzde; Normal ışık mikroskopları, Floresan mikroskoplar, X-ışınları mikroskobu ve Elektron mikroskopları kullanılmaktadır.

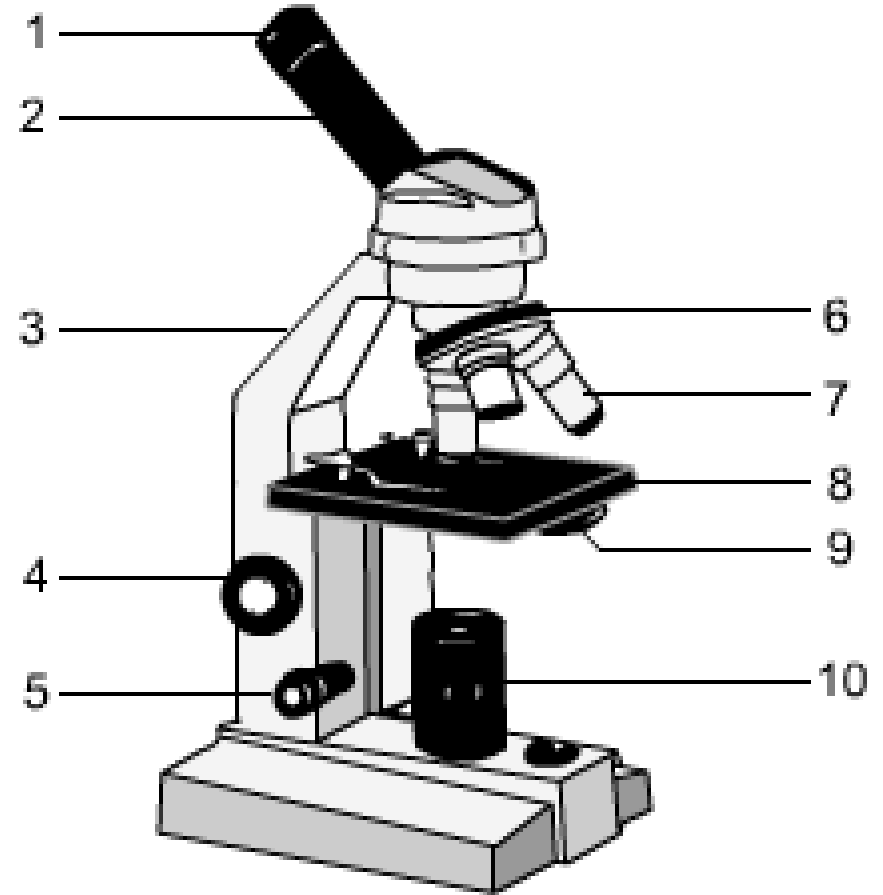
Işık Mikroskobu

Günümüzde kullanılmakta olan ışık mikroskopları, genel olarak $0.4 \mu\text{m}$ (400 nm) ile $0.7 \mu\text{m}$ (700 nm) arasındaki görünür dalga boyundaki ışınları kullanırlar.



Bu mikroskoplar mekanik ve optik olmak üzere iki ana bölümden oluşur.

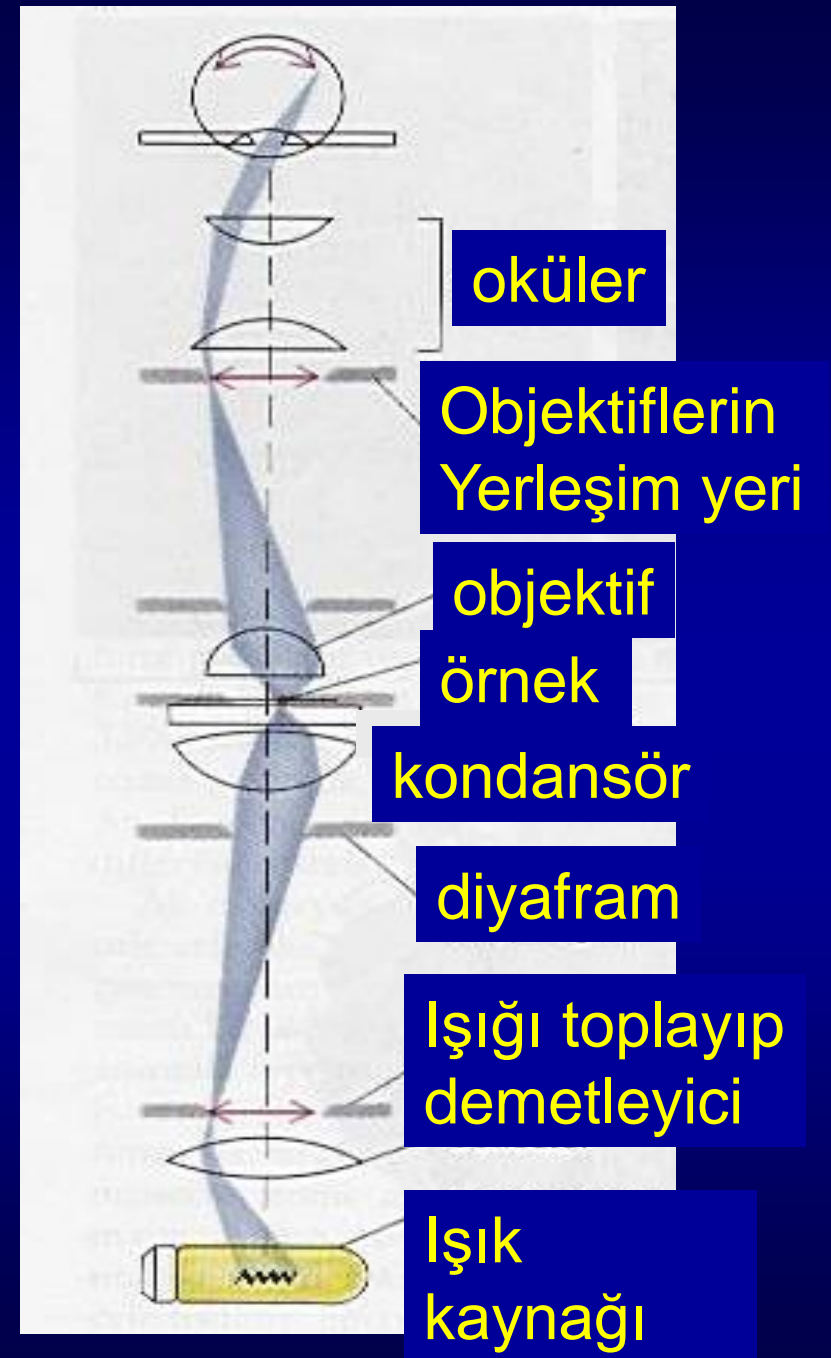
Mekanik bölüm; mikroskop ayağı, mikroskop gövdesi (statif), makro ve mikro ayar düzeneği, obje tablasından oluşur.



Optik bölüm;
mekanik bölüm
üzerine monte
edilmiş, görüntünün
alınıp incelenmesini
sağlayan kısımdır. Bu
bölüm: oküler, tüp
(mono, bino veya
trinoküler karakterde
olabilir), objektif,
kondansör ve ışık
kaynağı kısımlarından
meydana gelir.



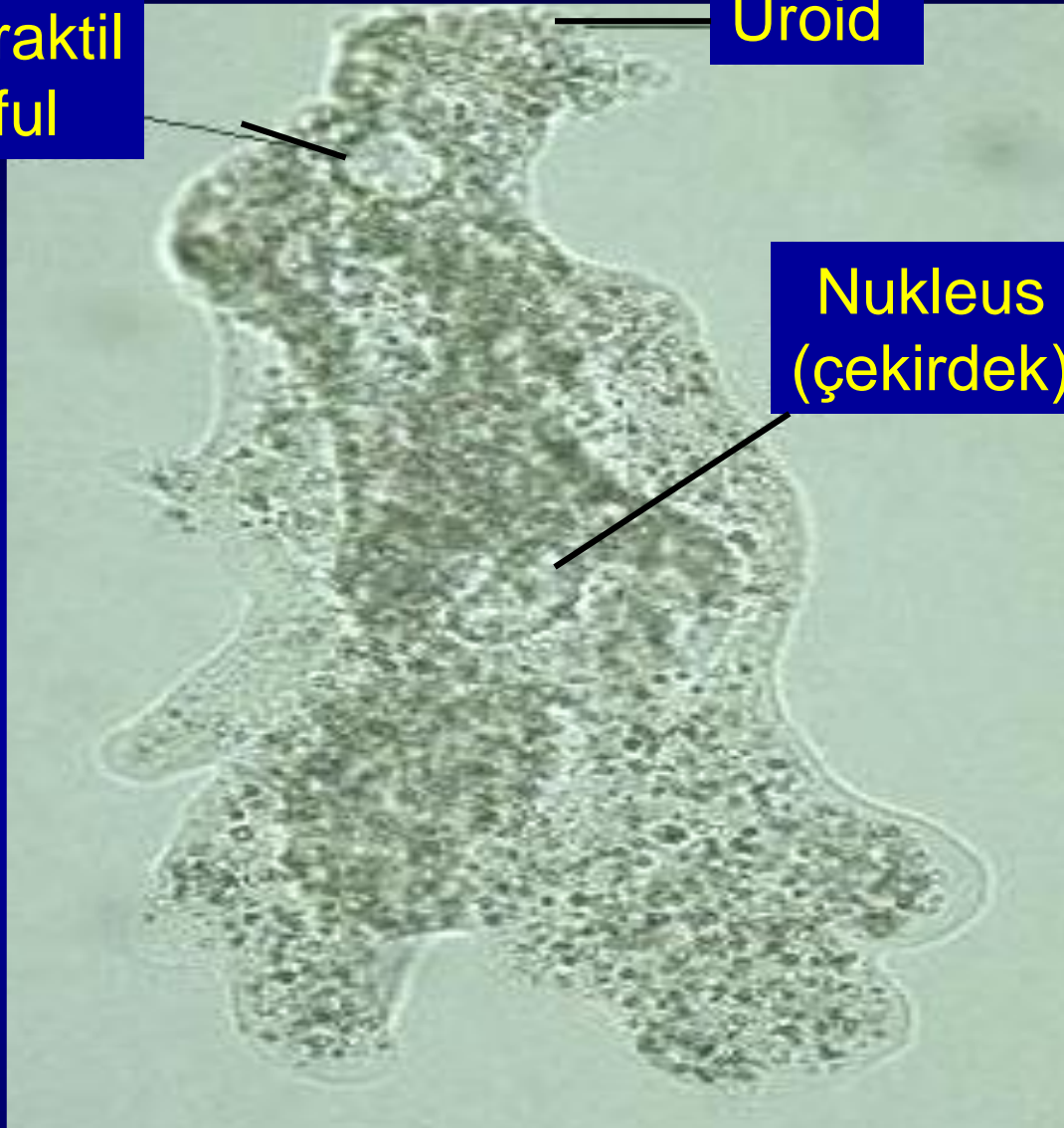
Işık kaynağından gelen ışınlar, kondansör sayesinde, obje tablası üzerine yerleştirilen cisme bir ışık konisi oluşturacak biçimde odaklanır. Cisimden yine bir ışık konisi şeklinde yayılan ışınlar objektif tarafından toplanarak oküler yardımıyla göze ulaştırılır.



Kontraktil
koful

Uroid

Nukleus
(çekirdek)



Bir amip'in ışık
mikroskopundaki görüntüsü

Ne tür objektif kullanılırsa kullanılsın, görüntü ne kadar büyütülürse büyütülsün normal ışık mikroskoplarıyla birbirlerine $0.2\ \mu\text{m}$ den daha yakın cisimler veya boyu $0.2\ \mu\text{m}$ den daha küçük cisimler iyi seçilemezler. Buradan hareket edilerek daha kısa dalga boylu ışınları, yani $0.4\ \mu\text{m}$ ($400\ \text{nm}$) den daha kısa dalga boyuna sahip floresan ışınları, kullanan floresan mikroskopları, hatta dalga boyu $0.004\ \text{nm}$ olan elektronları kullanan elektron mikroskopları geliştirilmiştir.

Floresan (Fluoresan) Mikroskop

Floresan maddeler belirli bir dalga boyundaki ışığı absorbe eder sonra daha uzun dalga boyunda tekrar yayarlar. Böyle bir bileşik, absorbe ettiği düşük dalga boyuna sahip ışık ile aydınlatılır sonra sadece o bileşikten yayılan ışınların geçişine izin veren bir filtre yardımıyla incelenirse karanlık bir fon içinde parlak bölgeler olarak görülür.

Bu özellikten faydalanılarak, çeşitli floresan boyalarla boyanmış cisimleri incelemek için floresan mikroskoplar geliştirilmiştir. Floresan mikroskop ile 0.1mm kadar olan cisimler incelenebilmektedir. Bu mikroskop normal ışık mikroskobu ile aynı yapıda olup ondan ışık kaynağı ve bazı optik parçaları yönünden farklılık gösterir.



görüntü

Engelleyici filtre

filtre

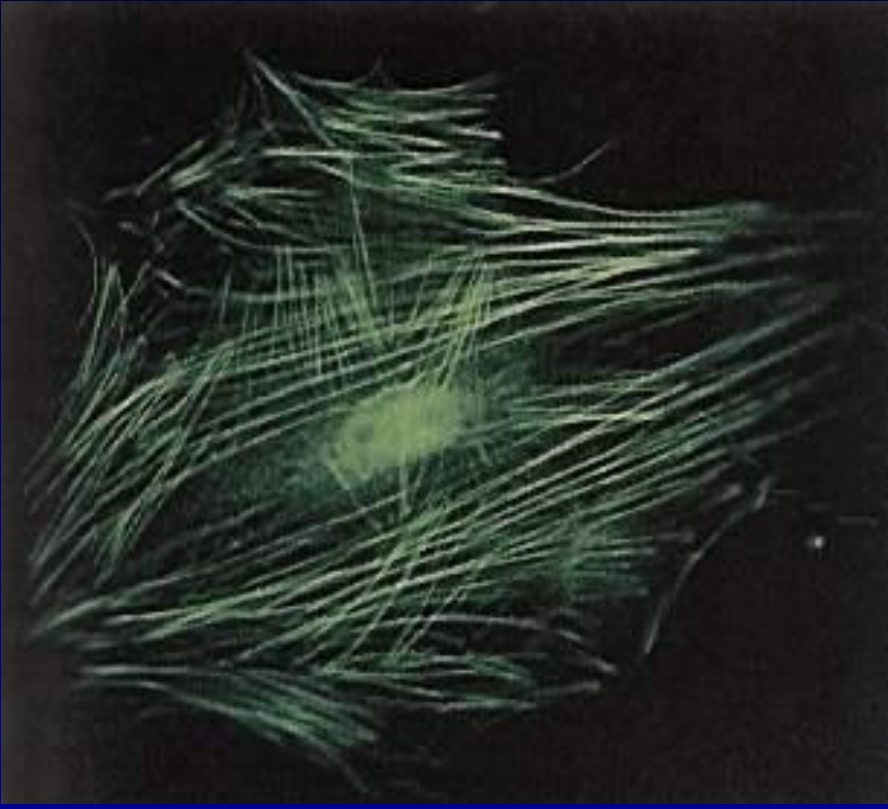
filtre

Işık kaynağı

objektifler

örnek

Bu mikroskoplarda, ışık kaynağı olarak ultraviyole dalga boyunda ışık veren, cıva buharlı ampuller kullanılmaktadır.



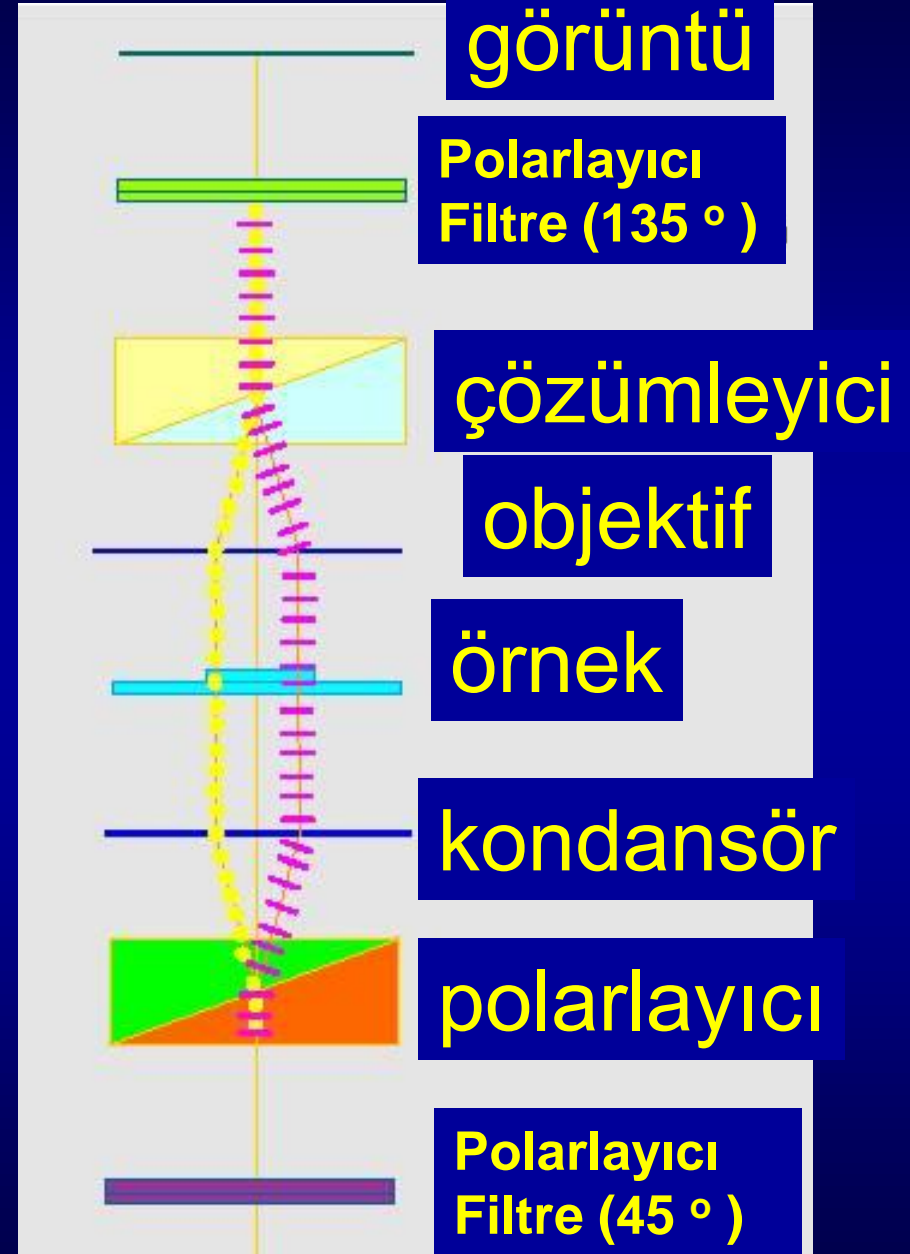
Kültürdeki bir fibroblastın
içindeki aktin filamentlerin
Dağılımının floresan mikroskobik
görüntülenmesi



Mitoz bölünme'nin Anafaz
Evresinin floresan
mikroskobik
görüntülenmesi

Polarizasyon Mikroskobu

Normal mikroskobuna ışık polarize edici 2 levha veya prizma ilave edilerek meydana gelir.

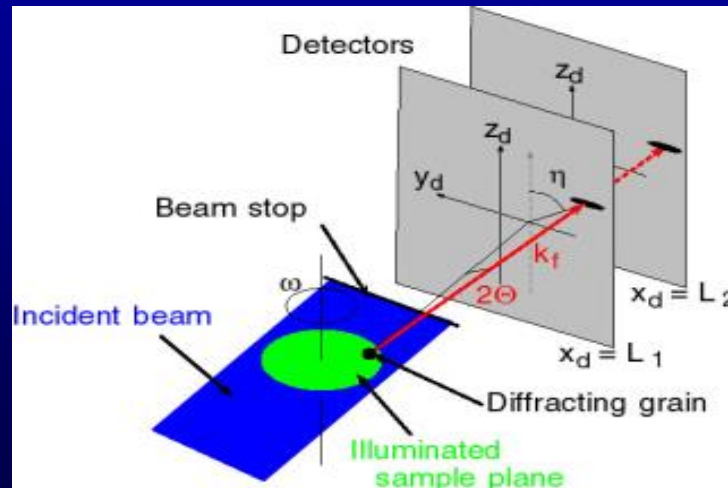
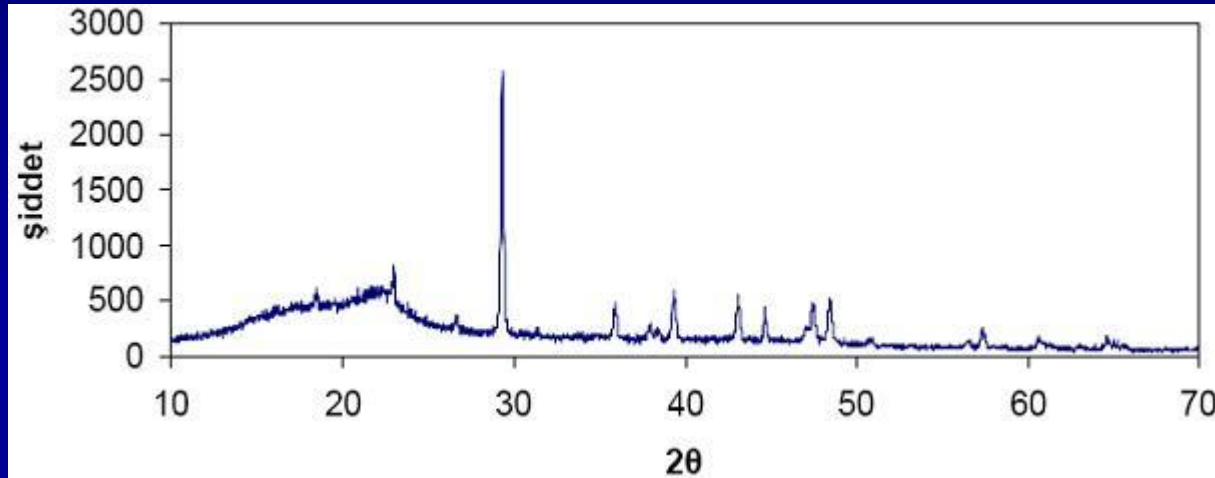


X - Işınları Mikroskobu

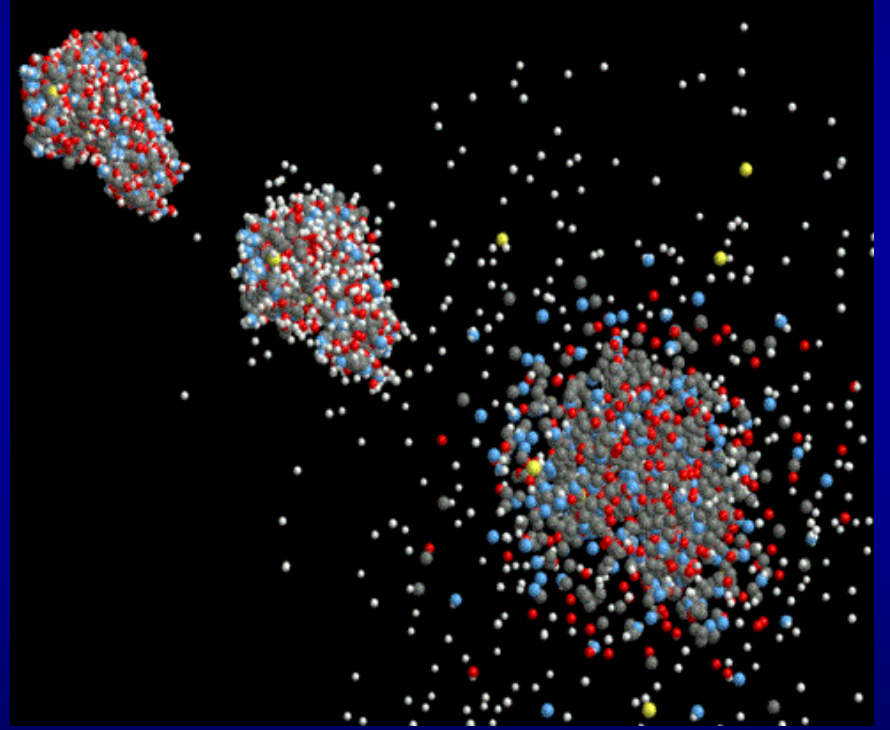
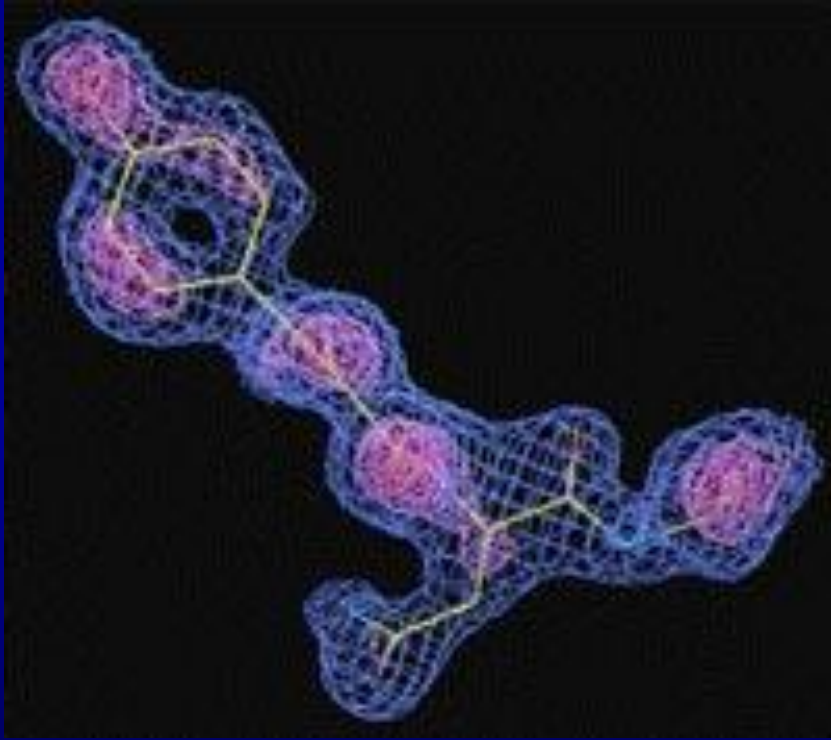
1 nm den daha küçük atom ve moleküllerin yapılarının incelenmesi için x-ışınları mikroskobu kullanılır. Bu mikroskobun mekanizması, küçük moleküllere rastlayan X-ışınlarının **yol değiştirmesi (kırınım-diffraction)** prensibine dayanır.



Bu sistemde elde edilen şekil, incelenen cismin görüntüsü olmayıp o cismin yapı özelliğini gösteren çeşitli, konsantrik noktalar veya çizgilerdir. Böylece x-ışınları kırınım mikrografları elde edilir.



Bu mikrograflarda ortaya çıkan konsantrik nokta ve çizgiler değerlendirilerek o molekülün yapısı ortaya konulur.



Bir hücre yüzey proteini

Elektron Mikroskobu

Elektronlar kullanılarak ayırma gücünün çok azaltılabileceği, yine elektronların hızları artırılarak dalga boylarının kısaltılabileceği prensibinden hareket edilerek oluşturulan elektron mikroskoplarında elektronların dalga boyu 0.004 nm ye kadar indirilebilmektedir.

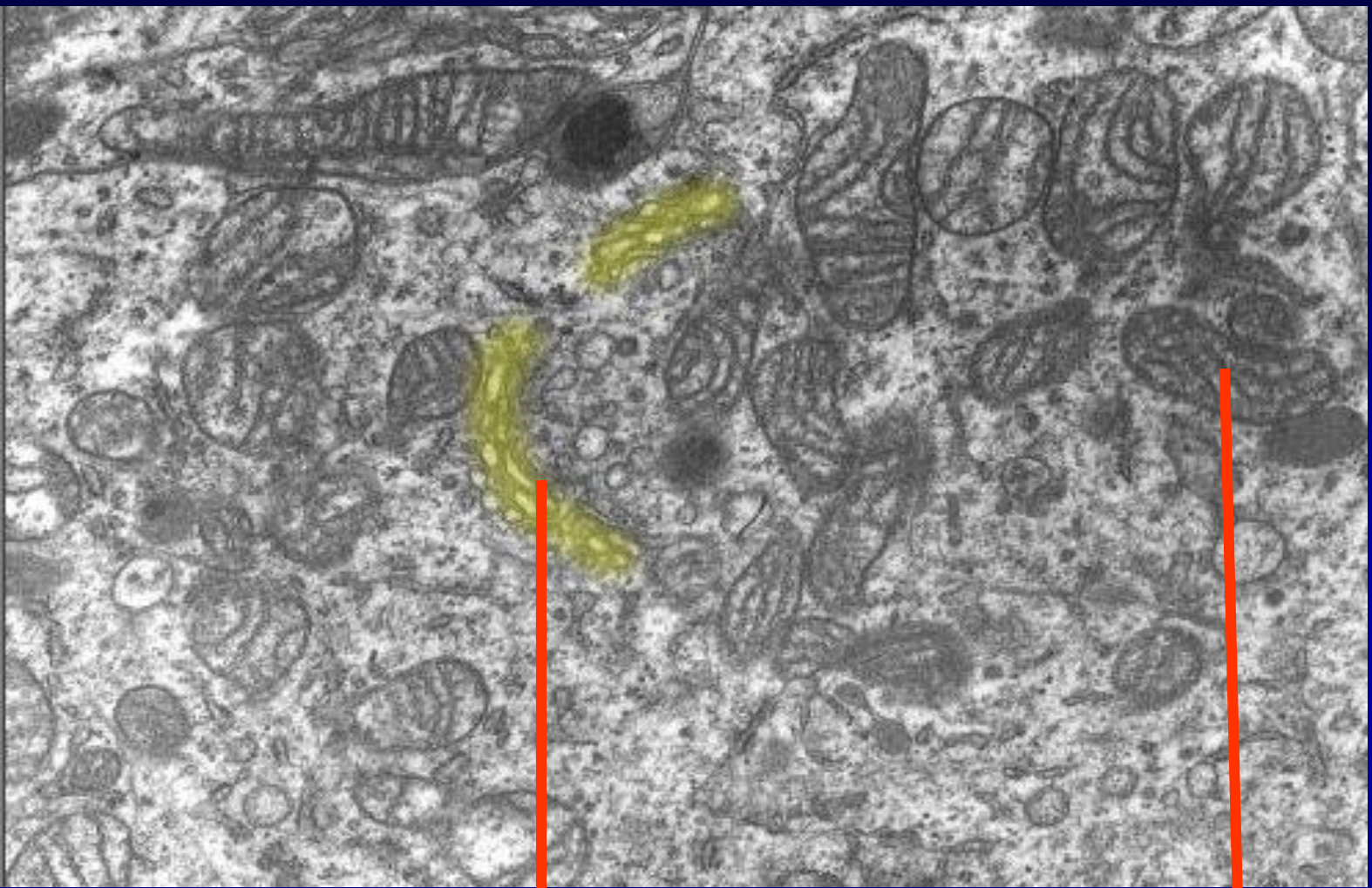
İncelenmek istenen
örneğe göre kullanılan
iki tip elektron
mikroskobu vardır.

Cisimlerden alınan
kesitlerin ince yapısını
inceleyen
**Transmission
Elektron Mikroskobu
(TEM)**



Cisimlerin üç boyutlu yapılarını inceleyen
Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) dur.





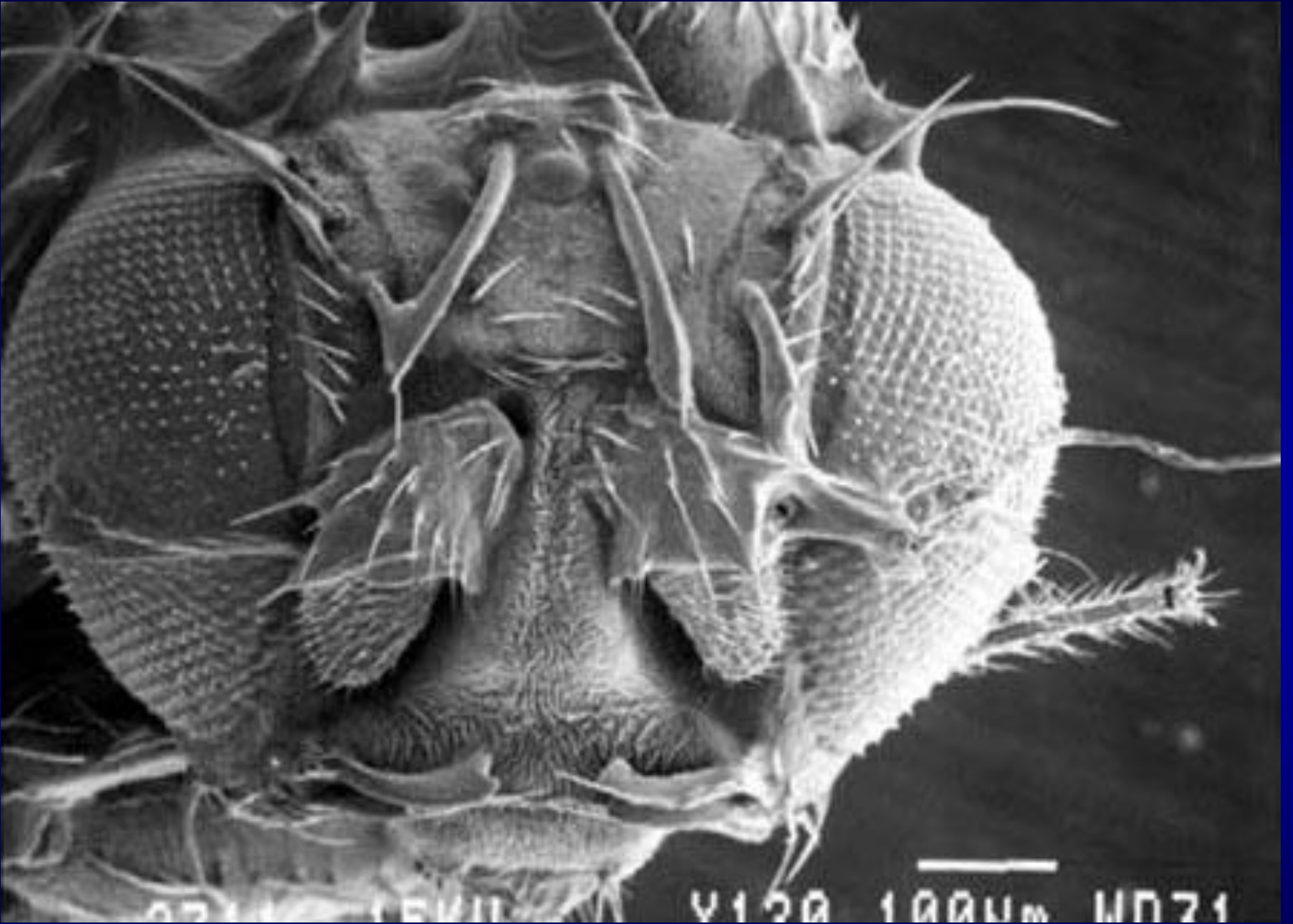
Golgi Kompleksi

Mitokondri

Bir hücrenin transmission elektron mikroskopik görüntüsü

TEM ile incelenen kesitler, doku ve hücrelerin iki boyutlu görüntüleridir. Ancak üç boyutlu bir görüntü elde etmek için **Scanning Elektron Mikroskobu (SEM)** kullanılır.

SEM'de de görüntü için elektronlar kullanılır fakat bu elektronlar, örneğin içinden geçmeyip örneğin yüzeyinden dağılırlar. Onun için bu metotta incelenecek örnek, tesbit (fiksasyon) işlemini takiben, çok ince olarak platin gibi ağır bir metalle kaplanır. Böylece inceleme sırasında bu metalden yansıyan elektronlar incelenen cismin dış yapısının üç boyutlu bir görüntüsünü oluştururlar.

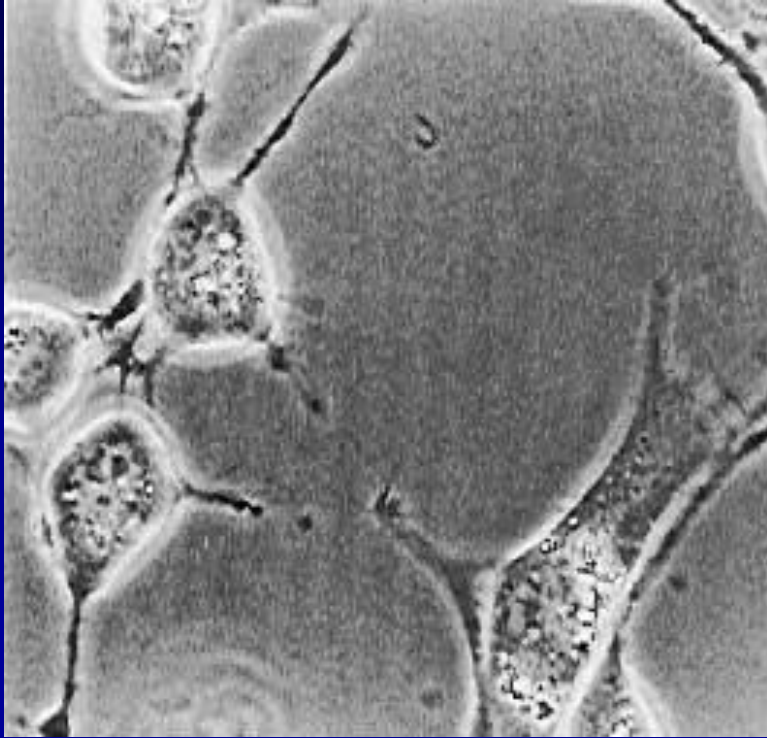


Bir böceğin SEM ile çekilmiş kafası

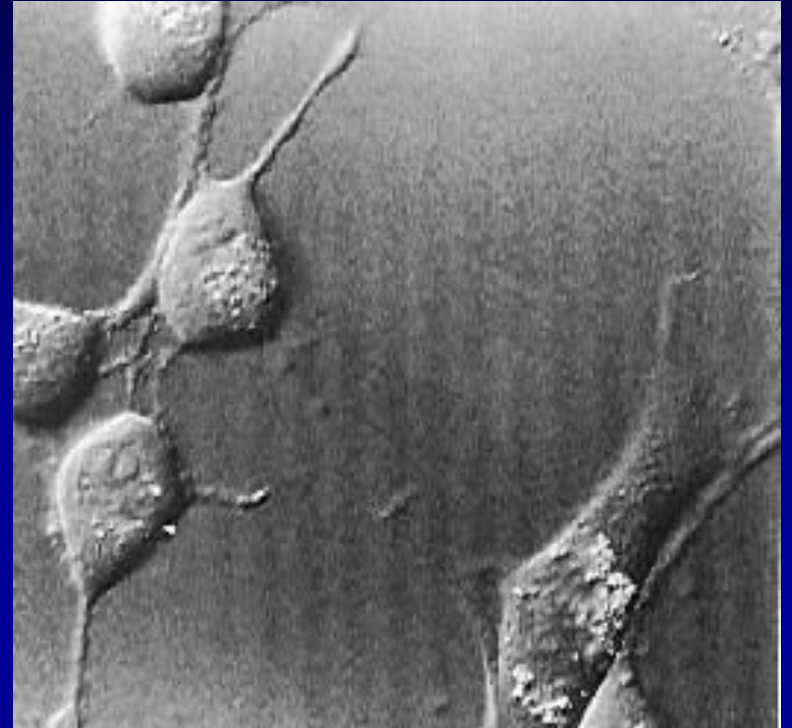
Canlı (Vital) inceleme

Vital inceleme; canlı bir hücrenin, hücreye zarar verilmeden sıvı bir ortam içerisinde mikroskop ile incelenmesidir. Bu inceleme sırasında hücre için zararsız veya çok az zararlı nötr kırmızısı gibi bazı boyalar kullanılmaktadır. Vital incelemelerde bazı özel mikroskoplar kullanılır. Bu mikroskoplar arasında

faz - kontrast mikroskobu,
interferans mikroskobu,
karanlık alan mikroskobu sayılabilir.



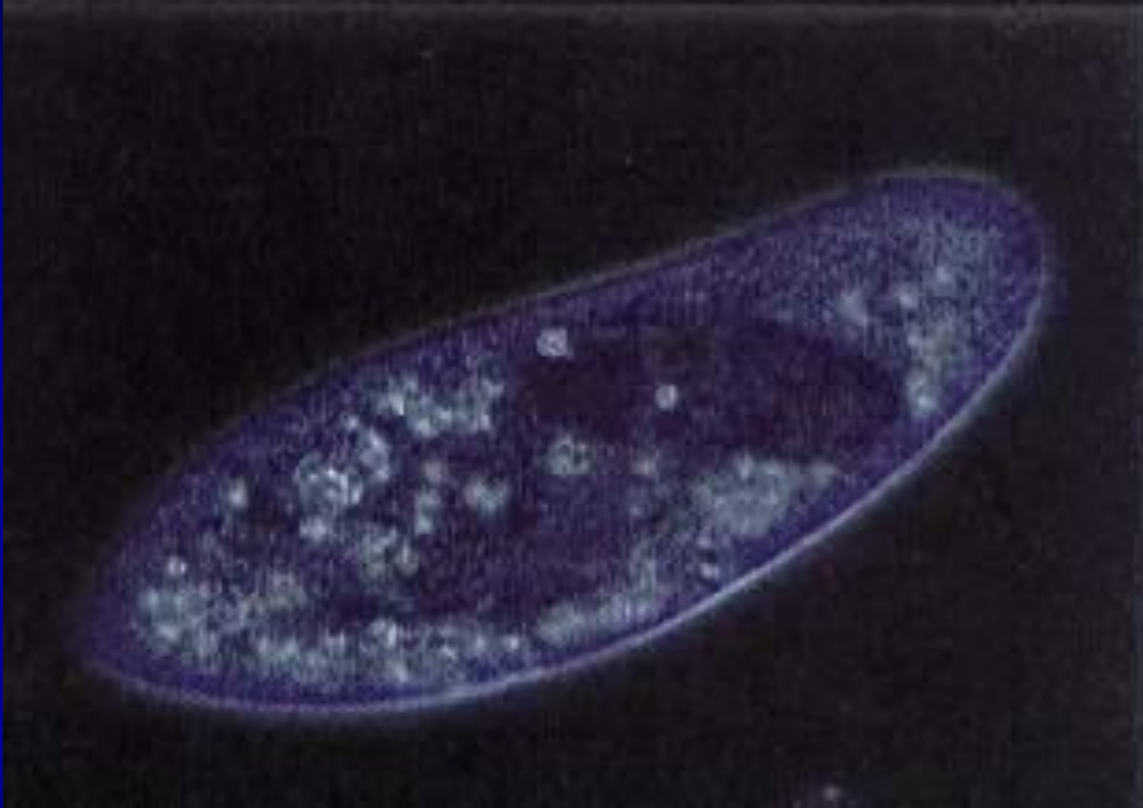
Faz-kontrast



İnterferans
Mikroskobu

**Kültürdeki fibroblastların faz-kontrast ve interferans
Mikroskoplarıyla çekilmiş mikrofotoğrafları**

Karanlık Alan Mikroskopunda görüntülenen paramecium



Bu mikroskopa incelenen bir hücrede karanlık bir sitoplazma zemini üzerinde nukleus, mitokondri ve lipid damlaları parlak bir şekilde görülür.

Hücre Kültürleri

Hücre kültür tekniği, hücre biyolojisi ile ilgili birçok problemin çözümünde kullanılan bir metottur.

Canlılar kendileriyle ilgili çeşitli besinleri ve büyüme faktörlerini genellikle dış ortamdan temin ederler.

İn vitro olarak da hücrelerin büyüüp gelişmesi için çeşitli dış faktörlere ihtiyaç vardır.

Bu nedenle kültür sistemleri in vivo şartların taklit edilmesiyle ortaya çıkmış olup halen çok yaygın olarak kullanılmaktadır.



Bu tekniğin temeli, değişik dokulardan alınan hücrelerin belirli ortamlarda saklanması ve bu ortamlar içinde büyüme yeteneği kazanmalarını sağlamaktır.

Bu teknik için çeşitli ortamlar geliştirilmiştir.

Bu ortamlarda genellikle;

kompleks karbohidrat karışımları,

amino asitler,

tuzlar, vitaminler,

hormonlar

ve çeşitli büyüme faktörleri bulunur.



Hücre Bileşenlerinin Analizi İçin Kullanılan Teknikler

Hücre bileşenlerinin incelenmesinde çok çeşitli kimyasal teknikler kullanılmaktadır. Bu sayede proteinler, yağlar, nükleik asitler v.s. tanımlanabilmektedir. Bu kimyasal tekniklere ilaveten daha da kapsamlı çalışmalar yapabilmek amacıyla değişik tekniklerde geliştirilmiştir. Bunlar arasında;

Hücreyi kısımlarına parçalayarak o kısımları inceleme tekniğini,

Rekombinant DNA teknolojisini örnek verebiliriz.

Hücreyi Kısımlarına Ayırma

Bu teknikte önce çeşitli mekanik ve kimyasal yollarla hücrelerin sınırları parçalanarak homojenize edilir. Elde edilen homojenat içindeki çeşitli organel veya makromoleküller;

kütlelerine göre (Rate zonal centrifugation) veya

yoğunluklarına göre (Equilibrium density - gradient centrifugation) kısımlara ayrılır.

Daha sonra da bu kısımlar çeşitli tekniklerle incelenir.

Homojenizasyon Teknikleri

Hücreleri parçalamak için günümüzde çok çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bunlar arasında; **ultrasantrifikasyon** ve çok değişik yapılardaki **homojenizatörler** kullanılarak gerçekleştirilen teknikleri sayabiliriz.

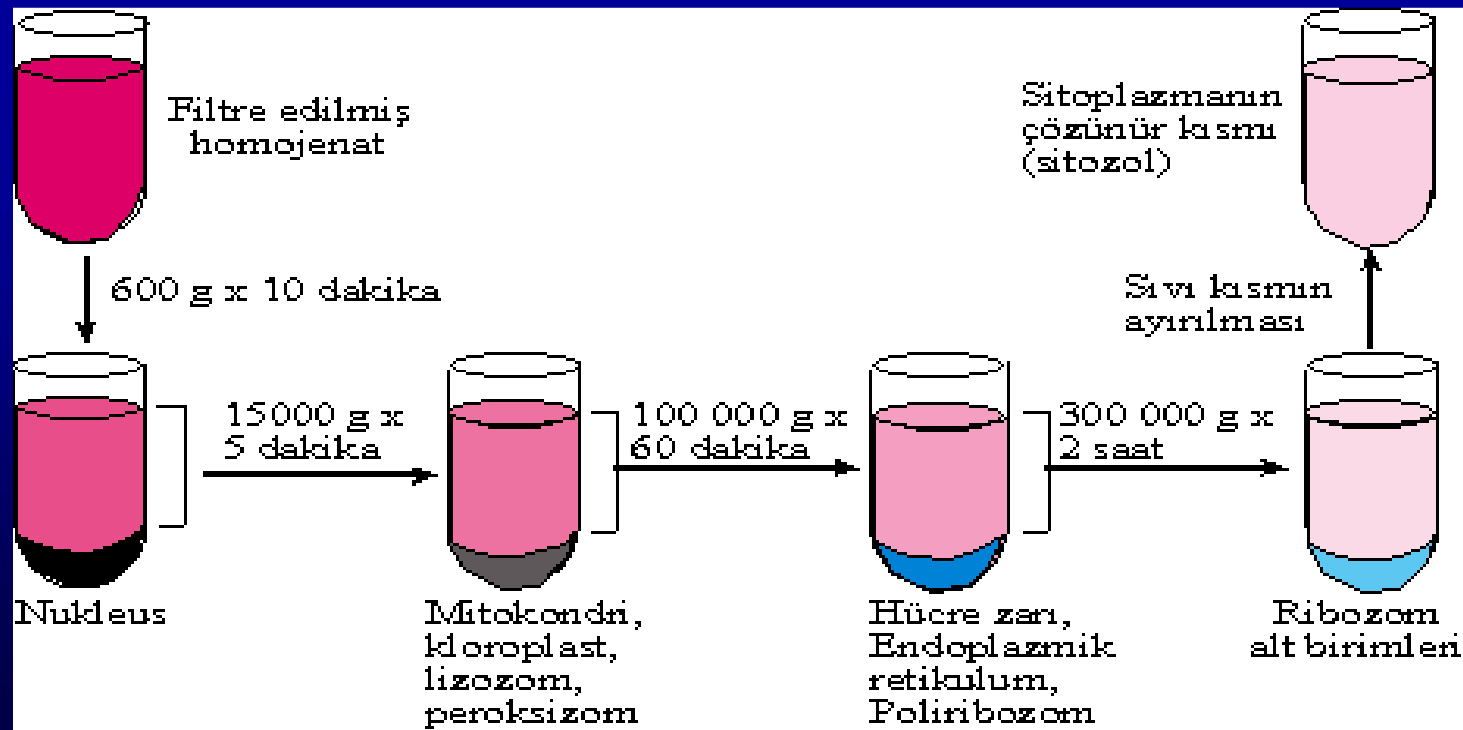
Homojenizasyon olayı bir **tampon çözeltisi** veya **sukroz çözeltisi** içinde yapılır. Sukroz kullanılmasının nedeni, sukrozun organel zarlarından geçememesi nedeniyle organellerde bir hasar oluşturmamasıdır. Yine kullanılan tampon çözeltilerinin pH'ı ve içerikleri homojenizasyonda çok önemlidir. Elde edilmek istenen makromoleküle öz tampon serileri seçilmelidir.

Santrifüj Yöntemleri

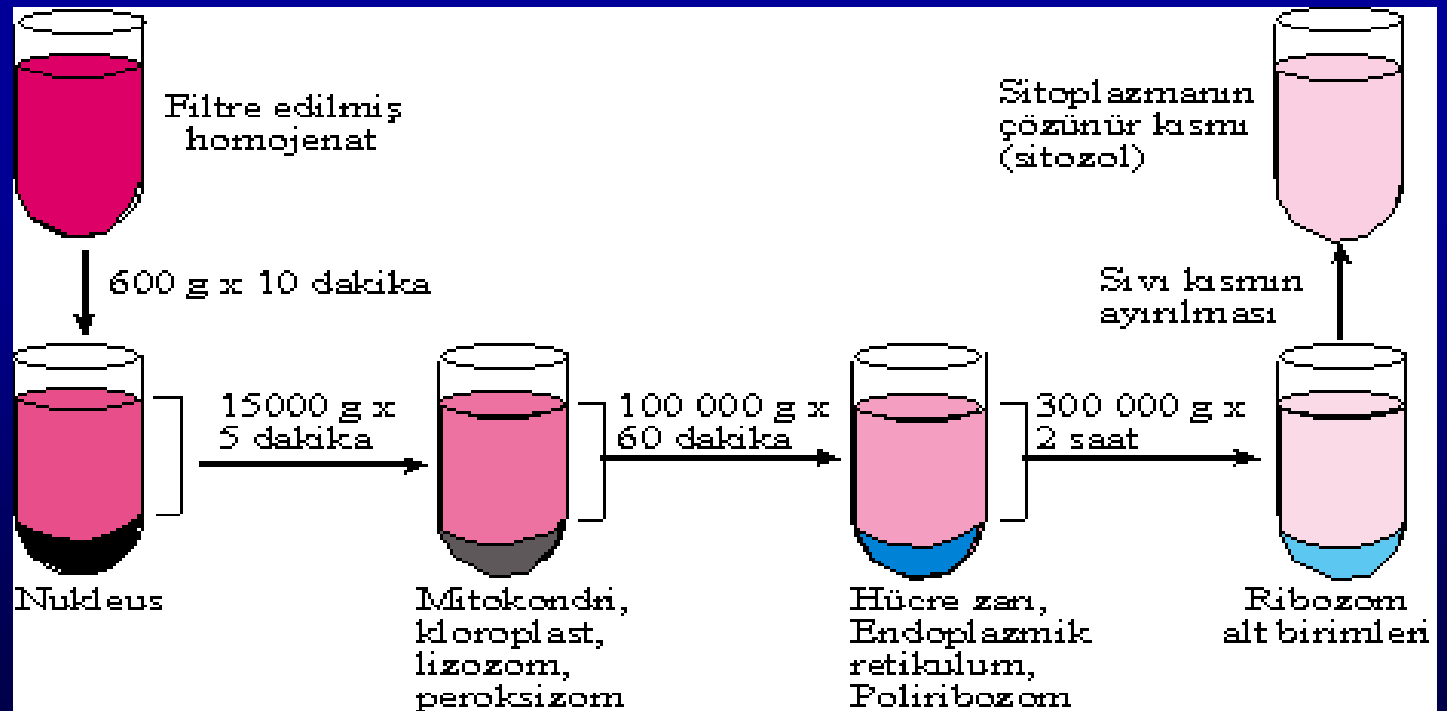
Santrifüj yöntemleriyle, farklı büyüklük ve yoğunlukta bulunan çeşitli organel veya partiküller, farklı çökme hızlarına sahip olmaları esasına dayanılarak, ayrı ayrı elde edilebilirler. Bu nedenle homojenize edilen hücreler önce **Ayırıcı (Differential - velocity) santrifüjemeye** sonrada ya kütlelerine göre **Rate - zonal santrifüjemeye** veya partikülleri yoğunluklarına göre ayıran **Equilibrium density gradient santrifüjemeye** tabi tutulurlar.

Ayırıcı (Diferential - velocity) santrifüjleme

Kısımlarına (fraksiyon) ayrılmak istenen homojenat gittikçe artan santrifüj kuvvetine maruz bırakılır. Her aşamada, santrifüj kuvveti ve süresi belirli bir fraksiyonun çökmesi için ayarlanır. Her aşamadan sonra **dipte çöken tortu (pellet)** alınıp özel inceleme için ayrılırken **üstte kalan sıvı kısım (süpernatant)** tekrar daha yüksek hızda santrifüj edilir.

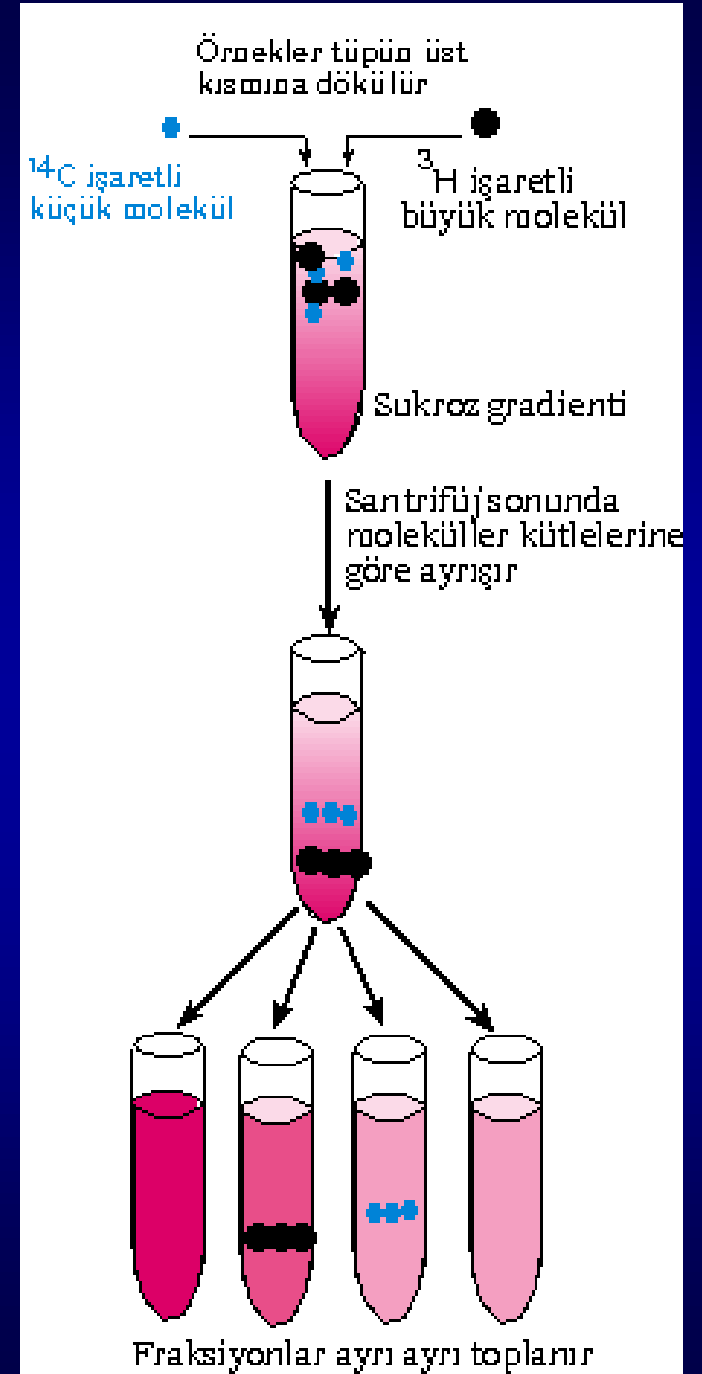


Böylece homojenat içindeki tüm fraksiyonlar ayrı ayrı elde edilir. Bu yöntem ile çok farklı kütle ve yoğunluğa sahip organel veya partiküller birbirinden ayrılabilirken, birbirine yakın kütle ve yoğunluğa sahip organel veya partiküller birbirinden ayrılamazlar. Bu nedenle bu yöntemle elde edilen fraksiyonlara tekrar partikülleri kütle veya yoğunluğuna göre birbirinden ayıran santrifüj teknikleri uygulanır.

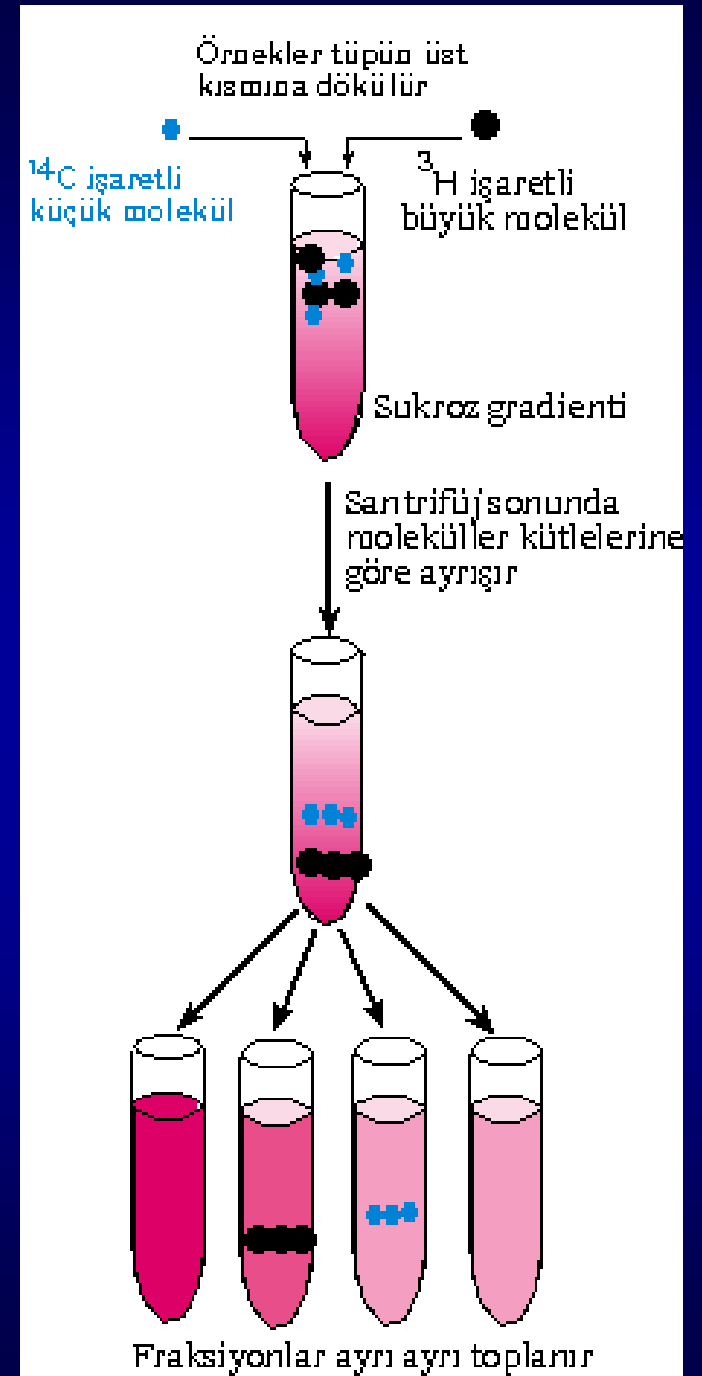


Rate - Zonal Santrifüjleme

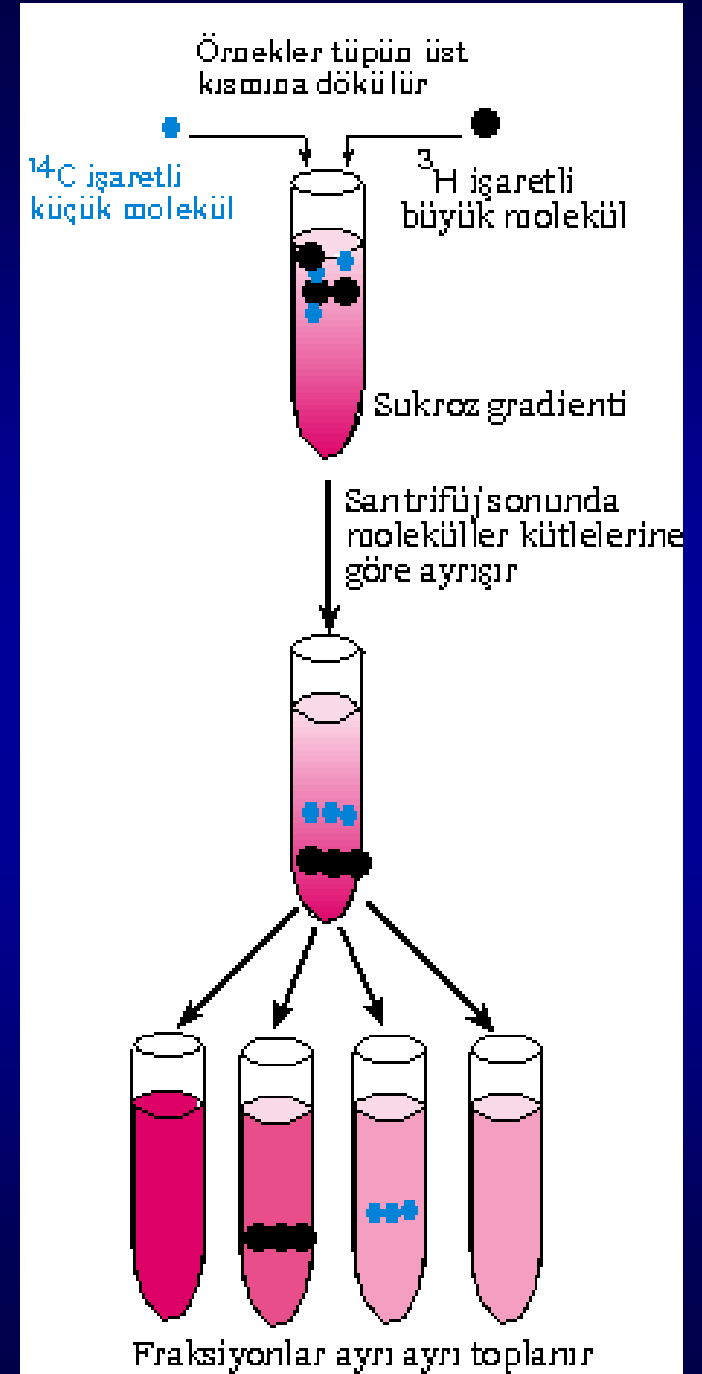
Bu yöntemde; daha önce elde edilen fraksiyonlar, içinde özel bir solusyon bulunan santrifüj tüpüne ilave edilirler. Tüpteki solusyon genellikle sukroz solusyonudur. Sukroz tüpe konulup santrifüj edildiğinde tüpün dibindeki kısım tüpün üst kısmına nazaran daha konsantre olacak şekilde yer alır.



Böyle bir tüpe eklenen homojenat santrifüj edilince partiküller santrifüj gücü, partikülün kütlesi, partikül ve ortamın (sukroz) yoğunluk farkı, partikül ve ortamın sürtünmesi tarafından kontrol edilen bir oranla tüpte yukarıdan aşağıya doğru hareket ederler. Santrifüj tamamlandığında farklı büyüklükteki moleküller tüp içerisinde farklı bölgelerde yer alırlar.

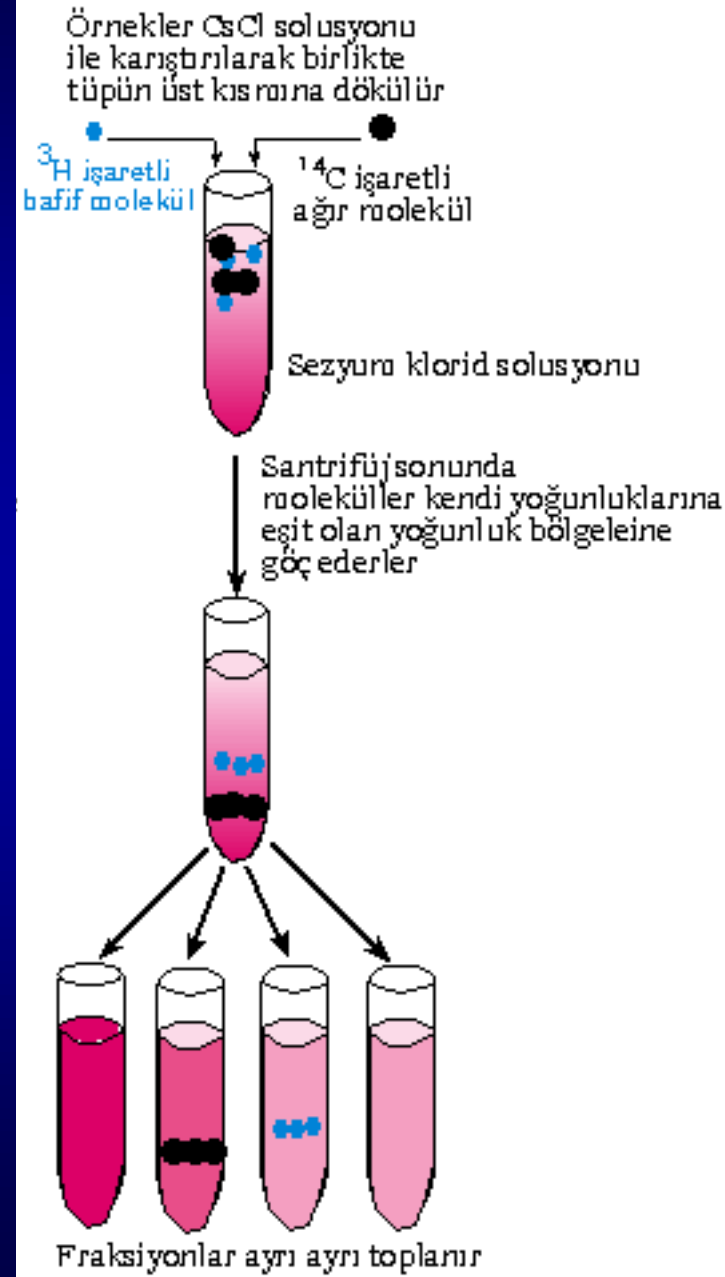


Bu nedenle bu tekniğe rate-zonal santrifüjleme adı verilir. Tüp içinde üstten aşağıya doğru değişik konsantrasyonda olacak şekilde yer alan sukroz çözeltisi santrifüjün hızlanma ve yavaşlamaları esnasında birbirinden kütlelerine göre ayrılmış olan fraksiyonların tekrar birbirine karışmalarını önler.

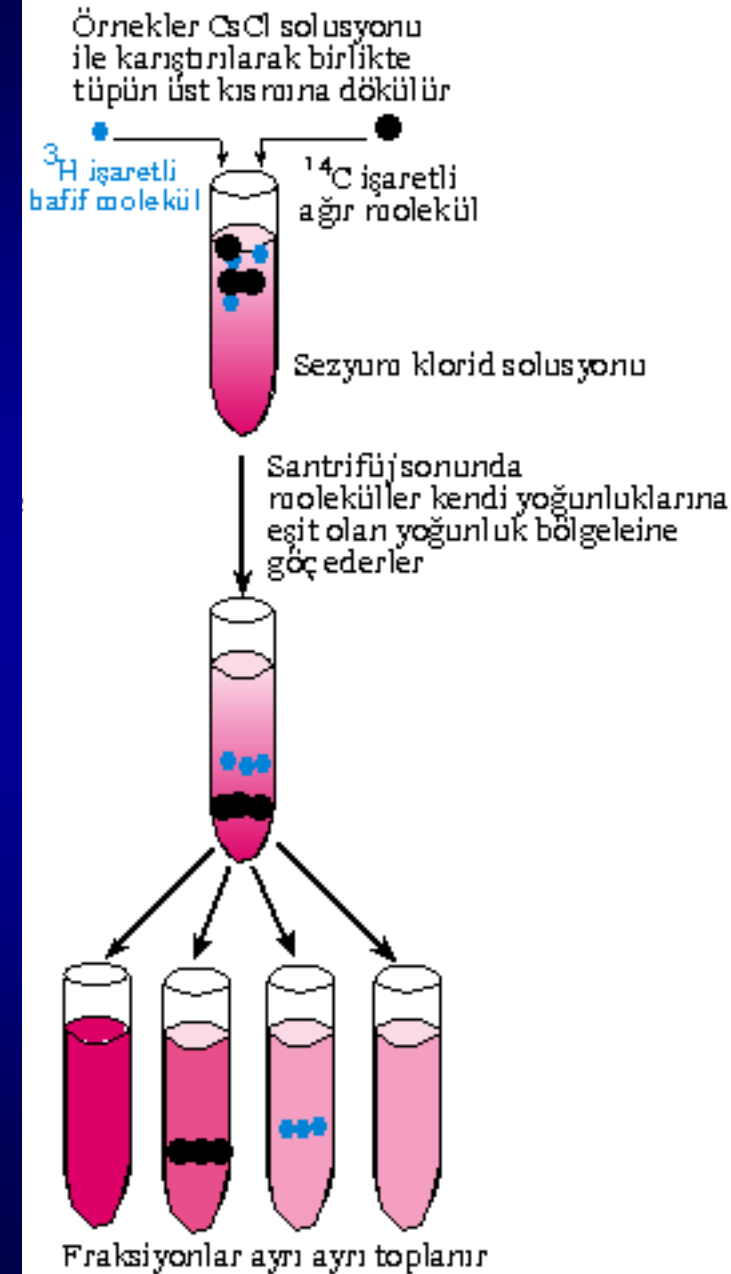


Equilibrium Density Gradient Santrifüjleme

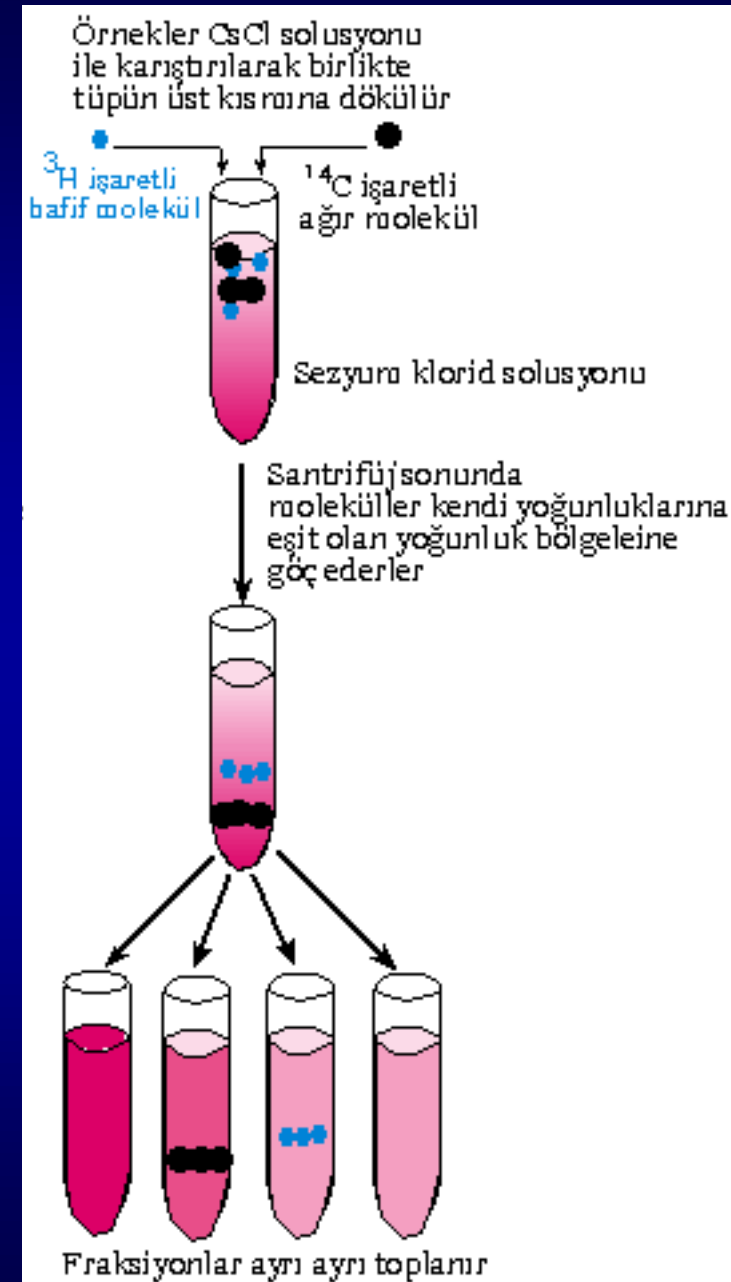
Rate zonal santrifüjemeye benzer. Bu yöntemde kullanılan solusyon en yaygın olarak sezyum kloriddir (cesium chloride = CsCl). Sezyum (Cs^+) iyonları çok yoğun oldukları için ultrasantrifüjlemede bir güç alanı oluşturarak çökerler. Bu yüzden tüpün dibinde daha fazla Cs^+ olmak üzere bir gradient oluşur. Bu esnada yükü nötralize etmek için Cs^+ u takip eden Cl^- iyonları da tüpün dibinde daha fazla bulunur.



Örneğin: Bu yöntemle birbirinden ayrılmak istenen protein, DNA ve RNA, sezyum klorid solusyonuna ilave edildiklerinde; yoğunluğu 1.3 olan protein, 1.3, 1.6-1.7 olan DNA ve 1.75-1.85 g/ml olan RNA kolaylıkla birbirinden ayrılabilir.



Burada verilen bu yoğunluklar, bu moleküllerin hücre içindeki yoğunluklarından farklıdır. Bunun nedeni solusyon içinde CsCl iyonlarının protein ve nükleik asitlere değişik oranlarda bağlanarak onların gerçek yoğunluklarını biraz artırmalarıdır. CsCl solusyonundaki Cs^+ iyonları proteinlere çok az bağlanırken DNA'ya fosfat gruplarından, RNA'ya ise fosfat grubundan ve ribozun hidroksil grubundan bağlanırlar. Bu nedenle içlerinde en yoğun olanı RNA dır.



Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, kısaca genlerin bir organizmadan alınarak üretilmesi (klonlama) ve üretilen bu genlerin çeşitli amaçlar için kullanılması olarak tanımlanabilir.

rDNA teknolojisinde kullanılan yöntemler 3 başlık altında toplanabilir.

Bunlar:

- Klasik uygulamalar,

- Hibridizasyon yöntemleri

- Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleridir.

Klasik Uygulamalar

rDNA teknolojisinde uygulanan tüm yöntemlerin temeli olan klasik uygulamalar 4 aşamada gerçekleşmektedir:

Restriksiyon endonükleaz adı verilen enzimler kullanılarak istenilen DNA fragmentlerinin kesilerek elde edilmesi.

Elde edilen bu fragmentlerin yine aynı enzimle kesilmiş uygun bir taşıyıcıya (vektör) aktarılması.

Fragment + vektör kompleksinin bir konakçı organizmaya aktarılarak çoğaltılması (klonlama).

Özel DNA fragmentleri içeren klonların seçimi.

Yabancı DNA

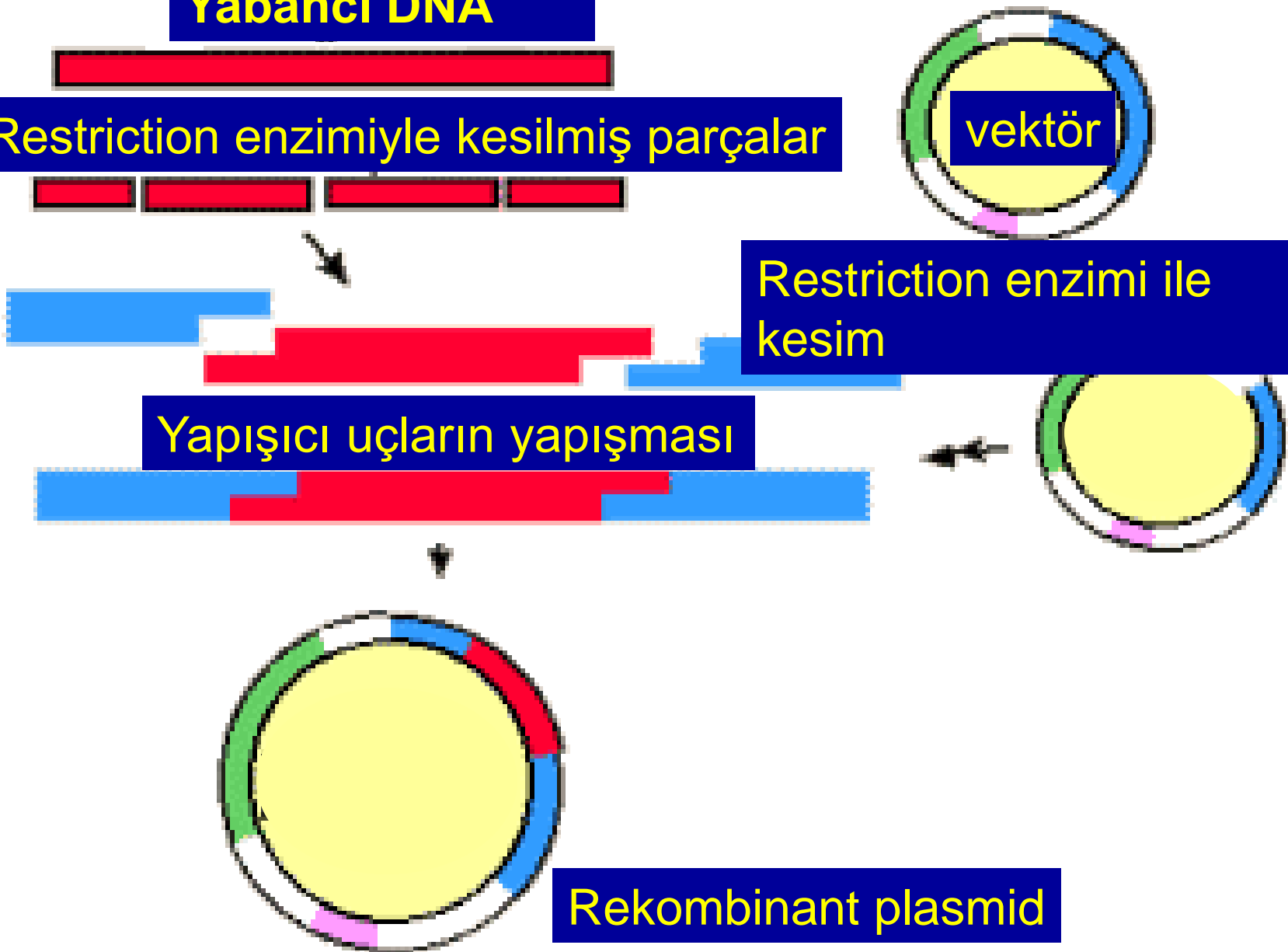
Restriction enzimiyle kesilmiş parçalar

vektör

Restriction enzimi ile kesim

Yapışıcı uçların yapışması

Rekombinant plasmid



Hibridizasyon Yöntemleri

Hibridizasyon yöntemleriyle hücre ya da bir mikroorganizmadaki özel fonksiyonlardan sorumlu bir genin veya DNA segmentinin var olup olmadığı ortaya konulur. Daha önceden çoğaltılıp hazırlanmış olan ve **prob** adı verilen özel DNA fragmentleri ile, özellikleri araştırılmak istenen hedef DNA molekülünün eşleştirilmesi olayına **hibridizasyon** denir. Çeşitli laboratuvarlar tarafından yaygın olarak kullanılan hibridizasyon yöntemleri:

1. Southern blot
2. Northern blot
3. Dot blot yöntemleridir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction = PCR)

PCR yöntemi; bir organizma veya bir mutant gene ilişkin, sağlam veya parçalanmış DNA veya RNA parçasının in vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan bir yöntemdir.

Bu yöntem saç teli, sperm gibi değişik dokulardan elde edilen 1-2 hücreden bile sonuca ulaşılmasını sağlar.

PCR yöntemi, bir gen veya DNA bölgesinin, bu bölgeye bağlanan oligonukleotid primerler aracılığı ile bir dizi replikasyon döngüsü geçirerek çoğaltılması işlemidir.

PCR yönteminde sözü edilen her replikasyon döngüsü

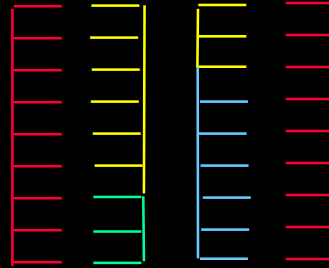
1. DNA'nın denatürasyonu

2. Primerin bağlanması

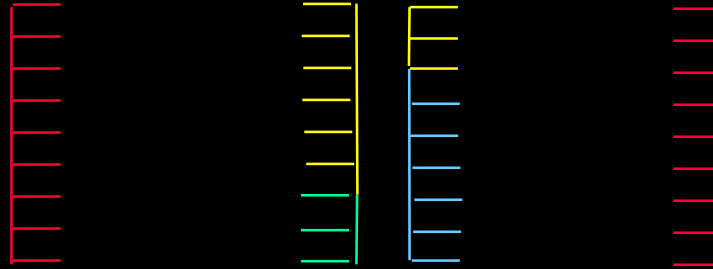
3. Primerin uzaması

olmak üzere 3 aşamada gerçekleşir.

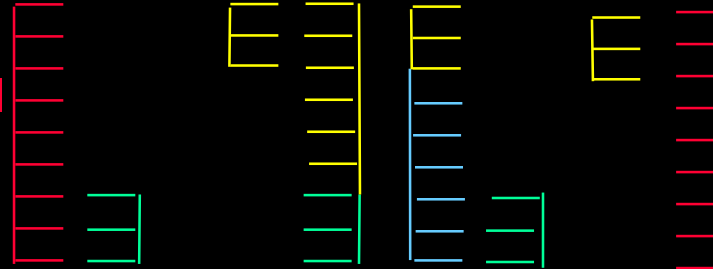
Çoğalma



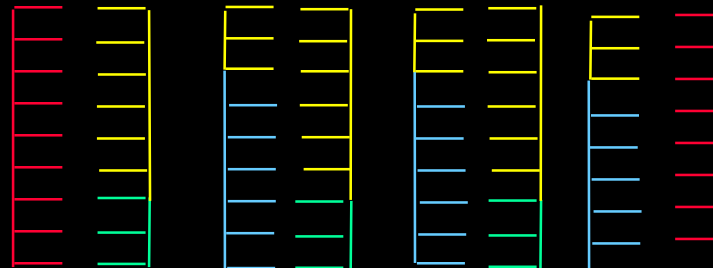
Denaturation
95-100° C



Primer bağlanması
45-60° C



Primer Uzaması
75-80° C



Bu döngüler tekrarlanarak istenen sayıda hedef DNA bölgesi elde edilir. Bir döngü yaklaşık 3-5 dakika sürer ve bu olay yaklaşık 20-40 kez tekrarlanır. Her döngüde oluşan ürün bir öncekinin 2 katıdır. Böylece yaklaşık 20 döngülük bir reaksiyon süresi sonunda yaklaşık 1 milyon DNA kopyası elde edilebilir.