

## Işık Mikroskoku

Mikroskop, çeşitli merceklerin kullanılması ve bu merceklerin düzenlenmesi ile objelerin görüntülerinin büyütülmesine olanak veren ve biyolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan bir alettir. Mikroskopun bir diğer önemli işlevi, objelerin büyütülmesini sağlarken, dereceli bir şekilde büyütülen objelerin çözünürlüğünü veya netliğini de artırmaktadır. Dolayısıyla, mikroskop objelerin büyütülmesi ve aynı anda dereceli bir şekilde objelerin çözünürlüğünü artırmaktadır. Görüntü büyütülmesi ve çözünürlük eş zamanlı düşünülmesi gereken iki olaydır.

Mikroskoplarda, çözünürlük ve görüntü büyütülmesi, **ışık** ve **mikroskop lensleri** ile sağlanmaktadır. Lensler, kullanılan ışığı çeşitli amaçlar için yönlendirmemizi sağlamaktadır. Görüntü büyütülmesi (magnification), sanıldığı gibi aksine, çözünürlük ile bire bir ilişkili değildir. Çözünürlük ile bağıntıyı aşağıdaki formül güzel bir şekilde özetlemektedir.

$$\text{Çözünürlük} = 0.61 \times \frac{\text{Işık kaynağının dalga boyu}}{\text{Sayısal açıklık/ayrılık (N.A)}}$$

Sayısal açıklık (numerical aperture), kullanılan lensin ışık toplama kapasitesinin, sayısal ifadesidir. Daha ayrıntılı bahsetmek gerekirse, N.A, belirli bir lensten yayılan ışığın açısının, geometrik olarak hesaplanmasıdır. Kullanılan objektif lensleri, N.A özelliklerine göre işaretlenmişlerdir. N.A ile çözünürlük arasında doğrusal orantı vardır. Bir başka deyişle, N.A değeri yüksek olan bir lensin, çözünürlüğü de yüksektir.

Kırılma indeksi ( $n$ ) (refractive index), ışığın kırılmadan, ne kadar iletildiğini/yayıldığını belirten sayısal bir ifadedir. Başka kelimelerle ifade etmek gerekirse, yayılan ışığın, kırılan ışığa oranını belirtmektedir. Kırılma indeksini belirten  $n$  değeri, kullanılan lensin ışık toplama kapasitesini ifade eder. Bir başka deyişle,  $n$  değeri ne kadar yüksekse, kullanılan lensin ışık toplayabilme kapasitesi o kadar büyük demektir. Örnek vermek gerekirse, yağın kırılma indeksi havaya göre daha büyüktür (yağ=1.5, hava = 1.0)

Görüntünün mikroskop ile görülebilmesi için, yüksek düzeyde *kontrast* gerekmektedir. Kontrastın, ışık yoğunluğu ve ışığın lenslerden geçme açısı değiştirilerek, ayarlanması mümkündür. Işığın aydınlatma merceğinden (condensor) gelme açısı, mikroskopta bulunan

ve diyafram diye tabir edilen (phase rings) bölümü ile ayarlanmaktadır. Kontrastı ayarlama da kullanılan bir başka yöntemde, aydınlatma kaynağının önüne konabilen filtrelerdir. Dahası, incelenecek olan örneğin çeşitli kimyasallar ile boyanması ile de kontrastı güçlendirmek mümkündür.

## **Mikroskop çeşitleri**

Lensler, filtreler ve ışık kaynağı, detaylı bir şekilde incelenmek istenen görüntünün, büyütülmesi ve çözünürlüğünün artırılması için kullanılmaktadır. İncelenmek istenen materyale göre ve sorulan bilimsel sorunun niteliğine göre, kullanılacak olan mikroskop seçilmelidir.

### **Aydınlık Saha Mikroskobu**

**Kullanım:** Kanlı ve sabitlenmiş doku örneği, hücreler ve mikroorganizmalar

**Avantajları:** Kullanımı kolay

**Nasıl çalışır:** Aydınlık saha mikroskobu, standart ışık mikroskobudur. Maksimum aydınlanmanın ulaşılmaması hedeflenmiştir (Koehler aydınlatması)

**Görünüm:** Beyaz arka plan üzerinde, gri veya koyu renk görüntü.

**Ne zaman ihtiyaç duyulur:** Prokaryot veya ökaryot organizma ile çalışılmak istendiğinde.

**Gereksinim:** 10X ve 40X objektif lensleri, 10X (oküler) göz merceği ve Işık kaynağı olan herhangi bir ışık mikroskobu

### **Karanlık Saha Mikroskobu**

**Kullanım:** Yansıtılmış ve kırılmış ışık ile boyanmamış ıslak örneklerdeki küçük yapıları gözlemlememizi sağlar.

**Avantajları:** Düşük kontrastlı veya boyanmamış örnekleri gözlemlememizi sağlar

**Nasıl çalışır:** İncelenmek istenen örnek, sadece gözlemlenmek istenen objelerin ışık kırınımına müsaade edecek bir biçimde aydınlatılır. Bu sayede, arka plan görünmez.

**Görünüm:** Koyu renkli arka planda, aydınlanmış objeler olarak görülür

**Gereksinim:** Karanlık alan engelleyicisi olan bir ışık mikroskobu. Engelleyici, mikroskop tablasının altında kalan kısımdaki yoğunlaştırıcının altına ki, filtre tutucusuna yerleştirilir.

### **Faz-Kontrast Mikroskobu**

**Kullanım:** Islak, boyanmamış ve lam- lamel arasına yerleştirilmemiş örnekleri, kontrast yardımıyla gözlemlememizi sağlar

**Avantajları:** Sabitlemeye ve boyamaya ihtiyaç yoktur

**Nasıl çalışır:** İki filtre eş zamanlı olarak kullanılır. Birinci filtre, çerçeveden gelen ışık haricindeki ışıkları engeller, ikinci filtre ise birinci filtreden kaynaklanan ayna görüntüsündeki, çerçeveden gelen ışığı engeller. Dolayısıyla, direk ışık engellenir ve direk olmayan, kırılarak dağılan ışık örneğe ulaştırılır.

**Görünüm:** Koyu renk ve açık gri renk görüntüler

**Gereksinim:** İki engelleyici filtre kullanılır. Bir tanesi yoğunlaştırıcının altına, diğeri objektif düzeneğinin içine monte edilmiş olmalıdır

### **Nomarski Görüntülemesi (DIC)**

**Kullanım:** Saydam olan ve hücre içindeki bölümleri gözlemlememizi sağlar.

**Avantajları:** Örneklerin sabitlenmesine ve boyanması gerekmemektedir, dolayısıyla canlı doku örnekleri veya hücrelerin gözlemlenmesine olanak sağlar.

**Nasıl çalışır:** Örneğin içinden geçen ışık, faz değişimleri meydana getirir. Bu faz değişimleri genlik farklarına dönüştürülür ve daha yüksek kontrast oluşturulmasına olanak verir.

**Görünüm:** Üç boyutlu görüntü.

**Gereksinim:** Özel olarak tasarlanmış objektif lensleri.

### **Flüoresans Mikroskobu**

**Kullanım:** Mikro organizmaların veya hücrelerin bölümlerini incelemek ve işaretlemek için kullanılır

**Avantajları:** Normal ışık ile gözlemlenmesi olanaksız olan, organ veya hücre bölümlerini görmemizi sağlar

**Nasıl çalışır:** Örnekler, flüoresans molekülleri ile işaretlenir. İşaretlenen bu moleküllerin uyarılmasıyla, yayılan ışık, filtreler ile işlenerek, renk ve kontrasta dönüştürülür.

**Görünüm:** Koyu bir arka plan ve canlı renkler

**Gereksinim:** Özel objektif lensi, uyarılabilen ışık kaynağı, kullanılan flüoresans boyalarına uygun optik lensler.

### **Ter (Inverted) Mikroskop**

**Kullanım:** Flasklardaki ve çukur kaplardaki (dish) canlı hücrelerin morfolojilerini ve kaplardaki yapışmış hücre örneklerinin doğal hallerinde (*in situ*) boyanmış görüntülerinin incelenmesi için kullanılır

**Avantajları:** Uzak çalışma mesafesi

**Nasıl çalışır:** Flaskların ve tabakların, yerleşimi için Yoğunlaştırıcı (condenser), objektifin üzerinde bulunmaktadır.

**Görünüm:** Koyu ve açık renk gri görüntüler

**Gereksinim:** Inverted mikroskop Faz-kontrast yoğunlaştırıcı, faz-kontrast objektifleri. 40X veya daha büyük objektif.

### **Konfokal (confocal) Mikroskop**

**Kullanım:** Organellerin, hücre iskeleti elementlerinin ve makro moleküllerin, hücre içindeki konumlarını belirlemek için kullanılır.

**Avantajları:** Sığ alan derinliği ile odak dışı parlamalar engellenir ve arka plan yoğunluğu azaltılır.

**Nasıl çalışır:** Flüoresans boyalarıyla, işaretlenmiş moleküller, lazer tarafından taranır. Taranan imgeler tekrardan işlemde geçirilerek, üç boyutlu görüntü elde edilir.

**Görünüm:** Çözünürlüğü artırılmış, standart flüoresans görüntü

**Ne zaman ihtiyaç duyulur:** Arka planın karmaşık olduğu, konum belirleme çalışmaları (örnek olarak, bakterinin veya proteinin hücre içindeki yerini tespit etmek için)

**Gereksinim:** Konfokal mikroskop ve bilgisayar

## **ELEKTRON MİKROSKOPU**

Elektron mikroskobu, aydınlatma kaynağı olarak, ışık yerine elektronları kullanmaktadır. Elektronların dalga boyu 0.04 nm'dir, görülebilen ışığın dalga boyundan yaklaşık 10000 kez daha küçüktür. Elektronların dalga boyu, görünür ışığın dalga boyundan daha kısa olduğundan, elektron mikroskobunun olanak sağladığı büyütme oranı ve çözünürlük, standart ışık mikroskoplarına oranla daha fazladır. Elektronlar kullanılarak erişilen görüntü büyütmesinin temel mekanizması, ışık kullanılan mekanizmalara benzemektedir ancak elektron mikroskobu için uygulanan teknolojiksel yaklaşım farklıdır. Elektron mikroskoplarında, elektronlar, elektron tabancasında üretilirler ve vakum tüpünde dolaştırılır ve hızlandırılırlar. Elektron huzmesinin odaklanması için, cam lenslerin yerine elektro

mıknatıslar kullanılmaktadır. Cam lensler sadece ilgili görüntünün büyütülmesi işlemi için kullanılmaktadır.

Elektron mikroskobunun kullanılması ve görüntü işlemi için örneklerin hazırlanması, standart mikroskoplar ile karşılaştırıldığında daha karmaşıktır. Bunun için elektron mikroskopları için özel görevliler ve elektron mikroskobu için ayrı üniteler atanmıştır.

### **Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)**

**Kullanım:** Hücre içindeki yapıları detaylı incelenmesini sağlar

**Avantajları:** Yüksek çözünürlük. Konumlama çalışmaları için immünolojik işaretleme yöntemi ile birleştirilerek kullanılması mümkündür

**Nasıl Çalışır:** Tungsten kaynak elektronları üretir. Elektronlar vakumda hızlandırılarak, elektro mıknatıslar ile sabitlenmiş, bölümlere ayrılmış ve boyanmış örnek üzerine odaklanması sağlanır. Görüntünü, film üzerinde veya fosforlu ekran üzerinde yakalanır.

**Görünüm:** Çapraz kesit şeklindeki siyah ve beyaz görüntüler

**Gereksinimler:** Transmisyon elektron mikroskobu

### **Taramalı (scanning) Elektron Mikroskobu (SEM)**

**Kullanım:** Hücre dışındaki bileşenleri ayrıntılı olarak incelememizi sağlar

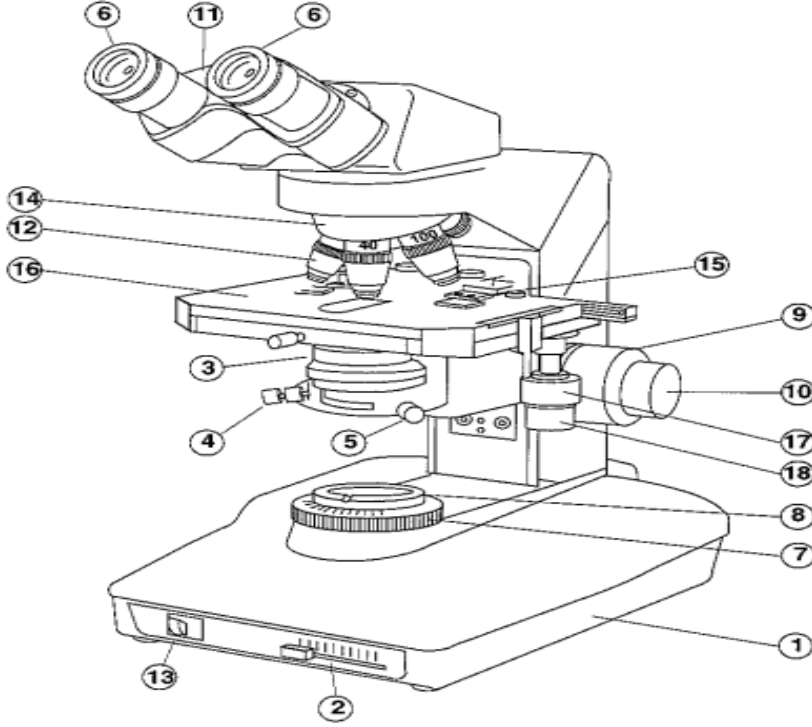
**Avantajları:** Yüksek çözünürlük. (Çözünürlük TEM'e göre daha düşüktür)

**Nasıl Çalışır:** Örnek, odağı sabitlenmiş elektron huzmesi ile taranır. Örneğe çarpan elektron geri yansır ve yansıyan elektronlar, mikroskop tarafından algılanır ve TV görüntüsü şeklinde çevrilir.

**Görünüm:** Hücre dışının üç boyutlu görünümü.

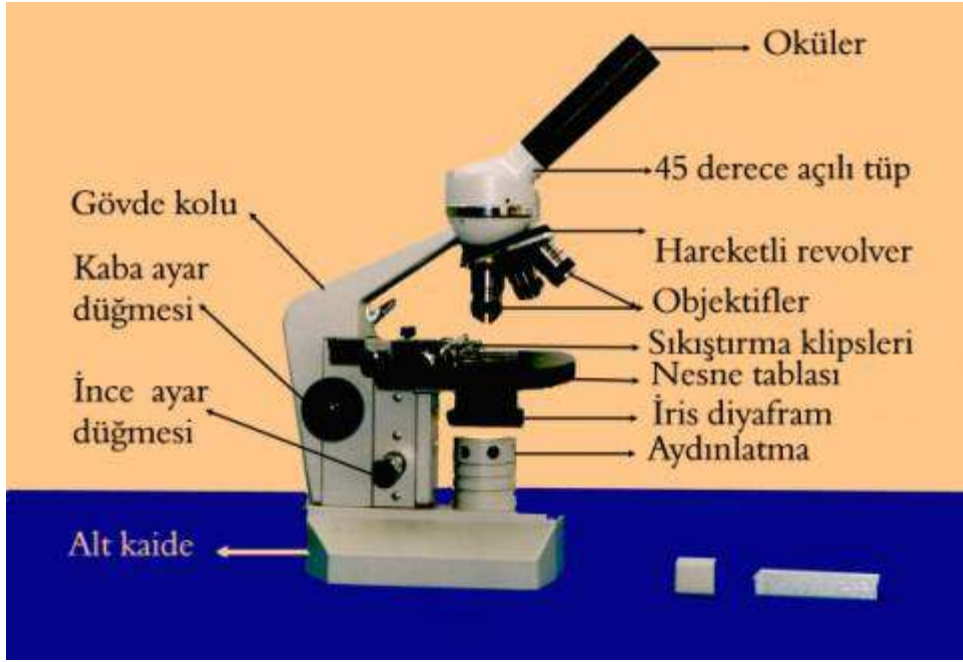
**Gereksinimler:** Taramalı elektron mikroskobu

## Mikroskop Kısımları



1. Alt kaide.
2. Aydınlatma kontrol kadranı. Işık yoğunluğunun kontrol edilmesini sağlar.
3. Kondansör. Mercek sistemidir, ışık kaynağından veya aynadan gelen ışınları örnek üzerinde toplar, örneğin aydınlatılmasını sağlar. Kondansör, çözünürlüğü, kontrastı, odak derinliğini ve aydınlığı etkiler.
4. Diyafram kontrol halkası. Örneğe gelen ışın huzmesinin çapını kontrol etmemize, dolayısıyla dağılan ışığı kontrol etmemizi sağlar.
5. Kondansör hizalama vidası.
6. Göz merceği (oküler)
7. Alan diyaframı kontrol halkası. Aydınlanma alanını/menzilini sınırlar.
8. Aydınlanma kaynağı
9. Kaba ayar düğmesi (makrovida)
10. İnce ayar düğmesi (mikrovida)
11. Göz mesafesi ayarlama konsolu
12. Objektif lensleri. Objektif lensin kuvveti, mikroskobun çözünürlüğünü belirler.
13. Güç düğmesi. Işık kaynağını açıp kapamamızı sağlar.

14. Hareketli revolver
15. Sıkıştırma klipsleri
16. Nesne tablası
17. Y-aksisi kontrol düğmesi. Preparatı yukarı ve aşağı hareket ettirmemizi sağlar.
18. X-aksisi kontrol düğmesi. Preparatı sağa ve sola hareket ettirmemizi sağlar.



([http://egitek.meb.gov.tr/dersdesmer/son\\_deney/deneyler/deney01.htm](http://egitek.meb.gov.tr/dersdesmer/son_deney/deneyler/deney01.htm))

**Aydınlatma Çeşitleri:** Halojen lamba (quartz ışığı), ışık yoğunluğu fazladır ve renk sıcaklığı fazladır, dolayısıyla, halojen lamba beyaz ışık verir. Halojen lambalar mikroskoplarda sıklıkla kullanılır ve en iyi aydınlatma kaynaklarından biridir. Tungsten lamba (akkor ışık), renk sıcaklığı düşüktür ve ışık sarımsı renktedir.

**Objektif lensleri:** Her objektif lensi, sahip olduğu N.A numarasına göre, çeşidine göre ve büyütme kuvvetine göre işaretlenmiştir.

**Örneklerin ölçümü:** Mikroskop altında incelenen örneklerin büyüklüklerini, tahminsel ölçebilmemiz için geliştirilmiş çeşitli mekanik yardımcılar vardır. Bu işlemler için kalibre edilmiş lamlar kullanılmaktadır (hemositometre). Petroff Hausse haznesi her ne kadar sayım işlemi için kullanılsa da, bu haznenin içerdiği karelere bölünmüş alan, boyut tahmini için kullanılmaktadır. Göz merceğinin içine yerleştirilen, oküler mikro metreler, kendi içinde

barındırdığı büyüklükleri bilinen çembersel şekiller ile de boyut tahmini yapılmasına olanak sağlar.

**Bazı biyolojik örneklerin boyutları;**

Prokaryotik hücre (*E. coli*) =  $0.4 \times 2 \mu\text{m}$

Maya (*S. Cerevisiae*) =  $1-4 \mu\text{m}$

İnsan kırmızı kan hücresi =  $7.2 \mu\text{m}$

Doku kültüründeki ökaryot hücre =  $10-100 \mu\text{m}$

Hücre çekirdeği =  $5-25 \mu\text{m}$

Mitokondri =  $1-10 \mu\text{m}$

Lizozom ve peroksisom =  $0.2-0.5 \mu\text{m}$

### **İmersiyon Yağının Kullanılması**

İmersiyon yağı, kullanıldığında lensleri ve lam ve lamel arasında sabitlenmiş örneği kaplar ve camın sahip olduğu kırılma indisine ulaşılmasını sağlar. İmersiyon yağının kullanım amacı maksimum çözünürlüğe ulaşmak içindir. Maksimum çözünürlük için, imersiyon yağı preparatın üstüne uygulanabildiği gibi, kondansör lensinin üzerine uygulanarak, lam-lamel örneğinin altında da bulunabilir. Farklı amaçlar için, farklı çeşitlerde imersiyon yağları bulunmaktadır.



## **PROTOKOL**

### **İmersiyon Yağının Objektif Lensi Üzerinde Kullanılması**

1. Mikroskop altında, daha detaylı incelenmek istenen bölge 40X objektif lensi ile belirlenir. Belirlendikten sonra, preparatın yeri değiştirilmeden 40X'lik objektif yağın bulaşmaması için değiştirilir.
2. Işık altında incelenmek istenen bölgeye, çok az miktarda (1 damla) imersiyon yağı preparatın üzerine uygulanır.
3. İmersiyon yağı objektif lensi preparatının üzerine getirilir ve ayarlanır
4. Kaba ayar ve ince ayar kullanılarak incelenmek istenen bölge bulunur.
5. Mikroskop ile inceleme işlemi tamamlandığında, imersiyon yağı temizlenir ( Bu işlem için eter veya xylene kullanılabilir)

### **Kondansör Lensinin Üzerine İmersiyon yağı Uygulanması**

1. Nesne tablasının boş olmasına dikkat edilir. Eğer nesne tablasının üzerinde preparat mevcut ise, preparat nesne tablasından uzaklaştırılır.
2. Kondansör lensinin üzerine bir damla imersiyon yağı uygulanır.
3. Preparatın alt tarafında kalan bölüme, incelenmek istenen alanın altına imersiyon yağı uygulanır.
4. Kondansör yükseltilir ve kondansör lensinin üzerinde ki yağ damlası ile preparatın altına uygulanan yağ damlasının birleşmesi sağlanır.
5. İncelenmek istenen bölgenin üzerine, preparatın üzerine bir damla imersiyon yağı uygulanır.
6. Kondansör, Koehler aydınlatmasına göre ayarlanır ve örnek mikroskop altında incelenir.
7. İnceleme tamamlandıktan sonra, kondansör lensi ve objektif lensi temizlenir

### **Hücre Yaymasının Yapılması (Cell smear)**

#### **Protokol**

1. Bir damla, hücre veya bakteri süspansiyon solüsyonu, lamın yüzeyine uygulanır. Hücre lekeli solüsyonu, eğer içinde serum var ise daha iyi yayılır.
2. Lamel, lam üzerinde, hücre solüsyonun eklendiği kısmın üzerine kapatılır ve örneğin yayılması beklenir.
3. Lamel üzerinden, hafifçe bastırılarak, hücre solüsyonu lam üzerine yavaşça ve hafifçe yaydırılır.
4. Yaydırılma işleminden sonra, lamel kaldırılır ve yayılan solüsyonun sabitleme ve boyanma işlemi için kuruması beklenir.

### **Örneklerin Sabitlemesi**

Birçok boya maddesinin özel sabitleyici kimyasalları mevcuttur. Bu kimyasallardan metanol, glüteraldehit, paraformadehit hücrelerin ve bakteri solüsyonlarının sabitlemesi için sıklıkla kullanılmaktadır.

1. İncelenmek istenen örneğin yüzeyine metanol uygulanır. Bu işlem için ufak tablalar ve beher kullanılabilir. Ek olarak, metanol, pipet ile de örneğin üzerine uygulanabilir. (Metanol, havadaki suyu emeceği için, boyama işlemi engeller)
2. 5 dakika bekletildikten sonra, metanol örnek üzerinden temizlenir.
3. Taze metanol tekrar uygulanır ve 5 dakika bekletilir
4. Hava ile kurumaya bırakılır.

### **Örneklerin Boyanması**

- Hücrelerin boyanması, hücrelerin mikroskop altında kolaylıkla incelenebilmesi için kontrast sağlamaktadır. Kullanılan boyanın çeşidi, incelemek istediğimiz hücre örneğine göre ve bilimsel araştırmamıza göre değişmektedir. Çeşitli hücreler için geliştirilen boyaların yanında, organeller için ve belirli kimyasallara tepki verecek özel Boyalarda geliştirilmiştir.
- Gram boyama aparatı, bakteri hücrelerinin boyanması için hızlı ve ideal bir yöntemdir. Bunun yanında Gram boyaları bozulmaya karşı dayanıklıdır. Gram boyasının içindeki, kristal mor boyası (crystal violet stain) maya hücrelerinin boyanması için de kullanılabilir ancak bu boya kullanıldığı takdirde, maya hücrelerinin

morfolojisi korunamamaktadır. Auromine boyası da birçok bakteri hücrelerini boyamaktadır ancak Gram boyası gibi bakteri türlerini ayırt etmemizi sağlamamaktadır.

- Wright boyası ve Giemsa boyası, kan hücrelerini ayırt etmemize olanak sağlar. Ayrıca bu boyalar, birçok ökaryot hücrelerin boyanmasını da sağlamaktadır ve kullanımları kolaydır.
- Metilen mavisi, her çeşit hücreyi boyamaktadır ancak hücreler ile ilgili detayları kaçırmamızı sağlayabilmektedir.