

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI
ÖĞRENİM REHBERİ
İÇİNDEKİLER

ÖĞRENİM REHBERİ NO	ÖĞRENİM REHBERİ BAŞLIĞI	SAYFA NO
1	%10'LÜK TAMPONLANMIŞ NÖTRAL FORMALİN TESPİT SOLÜSYONU HAZIRLAMA (1000 ML)	1
2	%4'LÜK PARAFORMALDEHİT TESPİT SOLÜSYONU HAZIRLAMA (100 ML)	2
3	BOUİNE TESPİT SOLÜSYONU HAZIRLAMA (155 ML)	3
4	FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU HAZIRLAMA (PBS) (1000 ML)	4
5	%2,5'LÜK GLUTERALDEHİT TESPİT SOLÜSYONU HAZIRLAMA (100 ML)	5
6	%1'LİK OSMİYUM TETROKSİT TESPİT SOLÜSYONU HAZIRLAMA	6
7	DENEY HAYVANINDAN DOKU ÖRNEĞİ ALINMASI	7
8	PERFÜZYON FİKSASYONU	8
9	PARAFİN DOKU TAKİBİ	9
10	TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBİ İÇİN DOKU TAKİBİ	10
11	SERT DOKU TAKİBİ-DEKALSİFİKASYON İŞLEMİ: FORMİK ASİT-SODYUM SİTRAT METODU	12
12	PARAFİN BLOKLARDAN KESİT ALMA	13
13	HEMATOKSİLEN-EOSİN BOYAMA PROTOKOLÜ	14
14	MASSON-TRİKROM BOYAMA PROTOKOLÜ	15
15	PERİODİK ASİT SCHIFF (PAS) BOYAMA PROTOKOLÜ	16
16	PARAFİN KESİTLERDE İNDİREK İMMUNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ	17
17	PARAFİN KESİTTE TUNEL BOYAMA YÖNTEMİ	19
18	DONMUŞ (FROZEN) BLOKLARDAN KESİT ALMA	21
19	DONMUŞ KESİTLERDE İNDİREKT İMMUNOHİSTOKİMYA (FLORESAN)	22
20	DONMUŞ KESİTLERDE İNDİREKT İMMUNOPEROKSİDAZ YÖNTEMİ	23
21	KALIN VE İNCE KESİT İÇİN BIÇAK HAZIRLANMASI	25
22	KALIN KESİT ALMA	26
23	MESA	27
24	TRİMLEME	28
25	İNCE KESİT ALMA	29
26	TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBİ İÇİN KESİT BOYAMA	30

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi -1

**%10'LUK TAMPONLANMIŞ NÖTRAL FORMALİN TESPİT
SOLÜSYONU HAZIRLAMA (1000 ml)**

Gerekli Malzemeler : Cam kapaklı şişe, cam mezür, distile su, % 37'lik formalin solüsyonu, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), sodyum dihidrojen fosfat mono hidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$), hassas terazi, manyetik karıştırıcı, balık

	Basamaklar	Gözlem
1	Hassas terazinin ayarı kontrol edilir.	
2	6,5 gram Na_2HPO_4 tartılır.	
3	4,0 gram $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ tartılır.	
4	Cam mezür ile 900 ml distile su ölçülür ve kapaklı cam şişe içine konulur.	
5	Stok formalin tespit solüsyonundan 100 ml ölçülür ve cam şişe içerisindeki distile su üzerine ilave edilir.	
6	Tartılan Na_2HPO_4 ve $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ cam şişe içerisine ilave edilir.	
7	Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırılır.	
8	Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletilir.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-2

%4'LÜK PARAFORMALDEHİT TESPİT SOLÜSYONU
HAZIRLAMA (100 ml)

Gerekli Malzemeler : Cam kapaklı şişe, cam mezür, fosfat tampon solüsyonu (PBS), toz paraformaldehit, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, balık, pH metre, çeker ocak

	Basamaklar	Gözlem
1	Hassas terazinin ayarı kontrol edilir.	
2	Eldiven giyilir.	
3	Çeker ocakta 4,0 gram toz paraformaldehit tartılarak cam şişe içerisine konulur.	
4	Cam mezür ile 100 ml PBS ölçülür ve kapaklı cam şişe içine konulur.	
5	Hazırlanan solüsyon içerisine 100 µl 10M NaOH ilave edilir.	
6	Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile ~ 60°C'da çözülünceye kadar karıştırılır.	
7	Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan solüsyonun pH'sı pHmetre ile ölçülerek 7.4 olarak ayarlanır.	
8	Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C 'de saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-3

BOUİNE TESPİT SOLÜSYONU HAZIRLAMA (155 ml)

Gerekli Malzemeler : Cam kapaklı şişe, cam mezür, pikrik asit, distile su, % 37'lik formalin solüsyonu, glasiyal asetik asit

	Basamaklar	Gözlem
1	Toz pikrik asit distile su içerisinde çözülerek doymuş pikrik asit solüsyonu elde edilir.	
2	Suda çözülmüş doymuş pikrik asit solüsyonundan 75 ml ölçülür ve kapaklı cam şişe içine konulur.	
3	% 37'lik formalin solüsyonundan 25 ml ölçülür ve pikrik asit solüsyonuna ilave edilir.	
4	5 ml Glasiyal asetik asit ölçülerek solüsyona ilave edilir.	
5	Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere oda sıcaklığında bekletilir.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-4

FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU HAZIRLAMA (PBS)
(1000 ml)

Gerekli Malzemeler : Cam kapaklı şişe, cam mezür, distile su, NaCl, KCl, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), pHmetre

	Basamaklar	Gözlem
1	Hassas terazinin ayarı kontrol edilir.	
2	8,0 gram NaCl tartılır.	
3	0,2 gram KCl tartılır.	
4	1,15 gram Na_2HPO_4 tartılır.	
5	0,2 gram KH_2PO_4 tartılır.	
6	Cam mezür ile 1000 ml distile su ölçülür ve kapaklı cam şişe içine konulur.	
7	Tartılan tüm tuzlar distile su içerisine ilave edilir.	
8	Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırılır.	
9	Hazırlanan solüsyonun pH'sı, pHmetre ile ölçülerek 7.2 olarak ayarlanır.	
10	Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C 'de saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-5

%2,5'LUK GLUTERALDEHİT TESPİT SOLÜSYONU
HAZIRLAMA (100 ml)

Gerekli Malzemeler : Cam kapaklı şişe, cam mezür, %25'lik gluteraldehit solüsyonu, potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), distile su, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, balık

	Basamaklar	Gözlem
1	Hassas terazinin ayarı kontrol edilir.	
2	A Solüsyonu hazırlanır: <ul style="list-style-type: none">- 3,628 gram KH_2PO_4 hassas terazi ile tartılır- 400 ml distile su ölçülür.- Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile çözülünceye kadar karıştırılır.	
3	B Solüsyonu hazırlanır: <ul style="list-style-type: none">- 4,744 gram Na_2HPO_4 hassas terazi ile tartılır- 400 ml distile su ölçülür.- Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile çözülünceye kadar karıştırılır.	
4	A solüsyonundan 20 ml, B solüsyonundan 80 ml ölçülerek A+B - 0.1 M fosfat tampon solüsyonu hazırlanır.	
5	92 ml A+B solüsyonu ölçülerek, içerisine 8 ml %25'lik gluteraldehit solüsyonu ilave edilir.	
6	Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C 'de saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-6

%1'LİK OSMİYUM TETROKSİT TESPİT SOLÜSYONU
HAZIRLAMA

Gerekli Malzemeler : Kahverengi cam kapaklı şişe, cam mezür, 0,1 gram OsO₄ (osmiyum tetroksit), distile su, potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), disodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), hassas terazi, manyetik karıştırıcı, balık, sülfirik asit,

	Basamaklar	Gözlem
1	Kahverengi şişe derişik sülfirik asit içinde bekletilerek temizliği sağlanır.	
2	Kahverengi şişe bol akar su ile yıkanır ve distile sudan geçirilir.	
3	Şişe 60°C'lik etüvde kurutulur.	
4	Kahverengi şişe içerisine 5 ml soğuk distile su konur.	
5	0,1 gramlık osmiyum tetroksit ampülü 1 saat sülfirik asit içerisinde bekletilir.	
6	Ampul pens ile tutularak bol akar su altında yıkanır ve distile sudan geçirilir.	
7	Ampul gazlı bez ile kurutularak kahverengi şişe içerisine hızlıca atılarak kırılması sağlanır.	
8	Hassas terazinin ayarı kontrol edilir.	
9	A Solüsyonu hazırlanır: - 3,628 gram KH ₂ PO ₄ hassas terazi ile tartılır - 400 ml distile su ölçülür. - Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüneye kadar karıştırılır	
10	B Solüsyonu hazırlanır: - 4,744 gram Na ₂ HPO ₄ hassas terazi ile tartılır - 400 ml distile su ölçülür. - Hazırlanan solüsyon, balık konarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüneye kadar karıştırılır.	
11	A solüsyonundan 20 ml, B solüsyonundan 80 ml ölçülerek A+B -0.1 M fosfat tampon solüsyonu hazırlanır.	
12	Eşit miktarda A+B solüsyonu ile stok osmiyum tetroksit solüsyonundan alınarak %1'lik solüsyon hazırlanır.	
13	Hazırlanan solüsyon kullanılmak üzere +4 °C 'de saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-7

DENEY HAYVANINDAN DOKU ÖRNEĞİ ALINMASI

Gerekli Malzemeler : Deney hayvanı, 25X20 cm ebatlarında köpük, topluiğne, cerrahi makas, bistüri, penset, dişli pens, tespit solüsyonu, cam şişe, 10X10 cm ebatlarında gazlı bez, kurşun kalem, kağıt, iplik, kloroform, cam fanus, pamuk, eldiven

	Basamaklar	Gözlem
1	Eldiven giyilir.	
2	Pamuk kloroform ile ıslatılır ve cam fanus içerisine konur.	
3	Deney hayvanı kafesinden alınarak cam fanus içerisine konularak derin anestezi sağlanana kadar beklenir.	
4	Deney hayvanı kuyruğundan tutularak, servikal bölgeye penset ile basılarak sağlanan servikal dislokasyon ile sakrifiye edilir.	
5	Deney hayvanı dört ekstremitesinde toplu iğneler ile köpük üzerinde sabitlenir.	
6	Bistüri yardımı ile, alt batin orta hatta kesi yapılarak, makas yardımı ile cilt- cilt altı dokusu kesilir.	
7	Kesi toraksa kadar uzatılarak peritondan ayrılan cilt- cilt altı dokusu sağ ve sol tarafa toplu iğnelerle köpüğe tutturulur.	
8	Periton orta hatta makasla kesilerek, sağ ve sol tarafa toplu iğnelerle tutturulur.	
9	Batin içi organlar makroskopik olarak gözlenir, istenilen organ çıkarılır.	
10	Göğüs kafesi açmak için, sternum alt ucundan ve sternumun her iki yanından kosto kondral bileşkeler boyunca yukarıya doğru kesi yapılır.	
11	Kalp ve akciğerler makroskopik olarak gözlenir, istenilen organ çıkarılır.	
12	Çıkarılan doku örnekleri 1X1 cm ebatlarında küçültülerek gazlı bez içerisine alınır ve kurşun kalem ile kimlik bilgilerinin olduğu kağıt ile beraber paketlenir veya kasetlenir.	
13	Çıkarılan doku örnekleri yeterli miktarda tespit solüsyonu içerisine alınır.	
14	Deney hayvanı etik koşullara uygun olarak biyolojik atıklar içerisine konulur.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-8

PERFÜZYON FİKSASYONU

Gerekli Malzemeler : Deney hayvanı, 25X20 cm ebatlarında köpük, topluiğne, cerrahi makas, bistüri, penset, dişli pens, tespit solüsyonu, cam şişe, gazlı bez, kloroform, cam fanus, pamuk, eldiven, serum fizyolojik 500 ml, damar yolu açma seti, % 10 formalin solüsyonu

	Basamaklar	Gözlem
1	Eldiven giyilir.	
2	Pamuk kloroform ile ıslatılır ve cam fanus içerisine konur.	
3	Deney hayvanı kafesinden alınarak cam fanus içerisine konularak derin anestezi sağlanana kadar beklenir.	
4	Deney hayvanı dört ekstremitelerinden toplu iğneler ile köpük üzerinde sabitlenir.	
5	Toraks altından kesi yapılarak cilt- cilt altı dokusu sağ ve sol tarafa toplu iğnelerle köpüğe tutturulur.	
6	Göğüs kafesi açmak için, sternum alt ucundan ve sternumun her iki yanından kosto kondral bileşkeler boyunca yukarıya doğru kesi yapılır.	
7	Kalp ve akciğerler makroskopik olarak gözlenir, kalbin apeksinden 5 ml serum fizyolojik drip infüzyon şeklinde verilir.	
8	Kalbin sağ atriyumuna kesi yapılarak serum fizyolojik gelene kadar infüzyona devam edilir.	
9	Kalbin apeksinden % 10 Luk formalin solüsyonu infüzyonuna başlanır.	
10	Deney hayvanı sertleşene kadar infüzyona devam edilir.	
11	İstenilen doku örnekleri uygun cerrahi işlemlerden sonra çıkarılır.	
12	Çıkarılan doku örnekleri 1X1 cm ebatlarında küçültülerek gazlı bez içerisine alınır ve kurşun kalem ile kimlik bilgilerinin olduğu kağıt ile beraber paketlenir ya da kasete alınır.	
13	Çıkarılan doku örnekleri yeterli miktarda tespit solüsyonu içerisine alınır.	
14	Deney hayvanı etik koşullara uygun olarak biyolojik atıklar içerisine konulur.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-9

PARAFİN DOKU TAKİBİ

Gerekli Malzemeler : Doku örneği, etil alkol (%60, 70, 80, 90, 96, 100), ksilen, parafin, cam kavanoz, 60°C etüv, blok kabı, % 10 formalin, pens, makas, kurşun kalem, kağıt

	Basamaklar	Gözlem
1	%10'luk formalin içerisinde tespit edilmiş doku örnekleri alınır.	
2	Doku örnekleri bir gece akar su altında yıkanır.	
3	Dehidratasyon işlemi, doku örnekleri % 60, % 70, % 80, % 90 etil alkol serilerinde 30'ar dakika, % 96 ve % 100 alkollerde 60'ar dakika tutularak yapılır	
4	Şeffaflaştırma işlemi, doku örnekleri alkol: ksilen karışımında 30 dakika, ksilende 2 değişim 60'ar dakika tutularak yapılır.	
5	İnfiltrasyon işlemi, doku örnekleri 60°C etüvde ksilen:parafin karışımında 30 dakika, parafinde 2 değişim 60'ar dakika tutularak yapılır.	
6	+4°C'de soğutulmuş blok kapları alınır.	
7	Doku örnekleri etüvden alınarak, bohçalar makas ile kesilerek açılır.	
8	Doku örneğinin bloklanacağı alana 1 ml erimiş parafin dökülür ve örnek pens yardımıyla tutularak kesit yüzeyi alta gelecek şekilde yerleştirilir.	
9	Örneğin üzeri erimiş parafin ile doldurulur ve kurşun kalemle kimlik bilgileri yazılmış kağıt parafin içine yerleştirilir.	
10	Tüm örnekler 8 ve 9. Basamaklar tekrarlanarak bloklama işlemi tamamlanır.	
11	Oda sıcaklığında tüm bloklar sertleşene kadar beklenir.	
12	Yeterli sertliğe ulaşan bloklar, blok kabından çıkartılarak uygun ortamda saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-10

**TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBİ İÇİN DOKU
TAKİBİ**

Gerekli Malzemeler : Bistüri, cam petri kabı, küçük şişe, cam beher, pastör pipeti, 0.1 M fosfat tampon solüsyonu, % 2,5'luk gluteraldehit solüsyonu, %2'lik osmiyum tetroksit, etil alkol (%50, 60, 70, 80, 90, 96, 100), propilen oksit, gömme materyali kiti (**Araldit kiti:** Araldite CY 212, DDSA, BDMA, Dibutilphtalate veya **Epon 812 kiti:** Epon 812, DDSA, MNA, DMP 30) gömme kapsülü, iğne, etüv.

	Basamaklar	Gözlem
1	Doku örnekleri, cam petri kabı içerisinde, bistüri yardımıyla 1X1mm ebatlarında küçültülerek %2,5'luk gluteraldehit solüsyonuna alınır.	
2	Doku örnekleri, %2,5'luk gluteraldehit ile 2 değişim 2'şer saat +4°C de tespit edilir.	
3	Doku örnekleri 0.1 M fosfat tampon solüsyonu ile 3-4 defa değiştirilerek yıkanır.	
4	1:1 oranında %2'lik osmiyum tetroksit ve 0.1 M fosfat tampon solüsyonu karıştırılarak %1'lik osmiyum tetroksit hazırlanır.	
5	Doku örnekleri, %1'lik osmiyum tetroksit içinde 60-90 dakika oda ısısında karanlıkta bekletilir.	
6	Doku örnekleri, 0.1M fosfat tampon solüsyonu ile 3-4 defa değiştirilerek yıkanır.	
7	Dehidratasyon işlemi, doku örnekleri % 50, % 60, % 70, % 80, % 90, % 96, % 100, % 100 etil alkol serilerinde 15'er dakika tutularak yapılır.	
8	Doku örnekleri 1:1 oranında % 100 etil alkol : propilen oksit karışımında 30 dakika tutulur.	
9	Doku örnekleri saf propilen oksit'de 30 dakika tutulur.	
10	Araldit ya da epon 812 karışımı hazırlanır. Araldit karışımı : Araldite CY 212 20 ml, DDSA 22 ml, BDMA 1.1 ml, Dibutilphtalate 0.5 ml karıştırılır. Epon 812 karışımı : A : Epon 812 20ml, DDSA 31 ml, B : Epon 812 20ml, MNA 17 ml, eşit miktarda karıştırılır ve DMP-30 1.3 ml gömme sırasında ilave edilir.	
11	İnfiltrasyon için dokular aşağıdaki karışımlarda bekletilir. 3 ölçü propilen oksit : 1 ölçü gömme materyali 1 saat 1 ölçü propilen oksit : 1 ölçü gömme materyali 1 saat 1 ölçü propilen oksit : 3 ölçü gömme materyali bir gece	

12	Dokular ertesi sabah gömme için kullanılacak gömme materyali içinde en az 2 saat bekletilir.	
13	Gömme kapsülleri gömme materyali ile doldurulur.	
14	Örnek adı yazılı kağıt gömme kapsüllerine yerleştirilir	
15	Dokular iğne yardımı ile kapsüllere yerleştirilir.	
16	Kapsülün içinde hava kabarcığı kalmışsa iğne ile çıkarılır.	
17	Kapsüllere gömülmüş doku örnekleri etüvde 37°C, 45°C ve 60°C'lik etüvde 24'er saat polimerize edilir.	
18	Kapsüller etüvden çıkarılarak uygun ortamda saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-11

SERT DOKU TAKİBİ - DEKALSİFİKASYON İŞLEMİ
FORMİK ASİT-SODYUM SİTRAT METODU

Gerekli Malzemeler : Kahverengi cam kapaklı şişe, cam mezür, sodyum sitrat, % 90 formik asit, distile su, hassas terazi, manyetik karıştırıcı, balık,

	Basamaklar	Gözlem
1	Fiksatif içinde bulunan sert doku örnekleri alınır.	
2	50 gram Sodyum sitrat 250 ml distile su içerisinde çözülerek A Solüsyonu hazırlanır.	
3	125 ml % 90'lık formik asit 125 ml distile su içerisinde karıştırılarak B Solüsyonu hazırlanır.	
4	A ve B solüsyonları eşit miktarlarda karıştırılır.	
5	Doku örnekleri formik asit - sodyum sitrat karışımı içerisine alınır.	
6	Her gün solüsyon değiştirilerek, iğne yardımıyla doku yumuşaması takip edilir.	
7	2-10 günlük süre boyunca dokulardan dekalsifikasyon işlemi gerçekleştirilir.	
8	Doku örnekleri 4-8 saat akar suda yıkanır.	
9	Rutin parafin doku takip işlemi yapılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-12

PARAFİN BLOKLARDAN KESİT ALMA

Gerekli Malzemeler : Parafin blok, mikrotom, polilizinle kaplı lam, 37 °C su banyosu, suluboya fırçası, buzdolabı, mikrotom bıçağı

	Basamaklar	Gözlem
1	Parafin blok 1 gün önceden +4°C buzdolabında sertleşmesi için bırakılır.	
2	37°C su banyosu açılarak ısınması sağlanır.	
3	Bıçak bıçak tutucusuna yerleştirilir	
4	Parafin bloğun kenarı, bıçağa paralel ve kesit alınacak yüz bıçağa bakacak şekilde blok tutucuya yerleştirilir.	
5	Parafinin fazlası doku örneği gelinceye kadar trimlenerek uzaklaştırılır.	
6	Doku örneğinden 5-7 µm kalınlığında kesitler alınır.	
7	Kesitler suluboya fırçası yardımıyla su banyosuna alınarak, açılmaları sağlanır.	
8	Lamlar üzerine gerekli bilgiler yazılır.	
9	Lamlar 45°'lik açı ile su banyosuna daldırılarak açılan kesitler lam üzerine alınır.	
10	Lamlar dik olarak konularak kurumaları sağlanır.	
11	Kesit alınan parafin bloğun kesit yüzeyi sıcak parafin ile kapatılır.	
12	Tüm kesitler 1 gece 37°C'lik etüvde tutularak lama yapışmaları sağlanır.	
13	Kesitler kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-13

HEMATOKSİLEN-EOSİN BOYAMA PROTOKOLÜ

Gerekli Malzemeler : Lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler, kapaklı cam kaplar, etil alkol (% 60, 70, 80, 90, 95), ksilen, cam mezür, distile su, hematoksilin, eosin, % 1 asit alkol solüsyonu, lamel, entellan, penset, lam asansörü, etüv.

	Basamaklar	Gözlem
1	Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler lam asansörüne yerleştirilerek 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.	
2	Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.	
3	Rehidratasyon işlemi için, % 95, % 80, % 70, % 60 etil alkol serilerinde 2'şer dakika tutulur.	
4	Kesitler 5 dakika akar suda yıkanır.	
5	Kesitler 5 dakika hematoksilin boya solüsyonunda tutulur.	
6	Kesitler 5 dakika akar suda yıkanır.	
7	Kesitler diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılır.	
8	Kesitler 5 dakika akar suda yıkanır.	
9	Kesitler 2-3 dakika eosin boya solüsyonunda tutulur.	
10	Kesitler 1-5 dakika akar suda yıkanır	
11	Kesitler 1 dakika % 80 alkol içinde tutulur.	
12	Kesitler 1 dakika % 95 alkol içinde tutulur.	
13	Kesitler 1 saat ksilende tutulur.	
14	Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır ve penset yardımıyla hava kabarıkları çıkarılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-14

MASSON-TRİKROM BOYAMA PROTOKOLÜ

Gerekli Malzemeler : Lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler, kapaklı cam kaplar, etil alkol (% 60, 70, 80, 90, 95), ksilen, cam mezür, distile su, Masson's trikrom boyama kiti- (ADR 2101098X), lamel, entellan, penset, lam asansörü, etüv.

	Basamaklar	Gözlem
1	Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler lam asansörüne yerleştirilerek 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.	
2	Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.	
3	Rehidratasyon işlemi için, % 95, % 80, % 70 etil alkol serilerinde 2'şer dakika tutulur.	
4	Kesitler 5 dakika distile su ile yıkanır.	
5	Kesitler 10 dakika Weighert's çalışma çözeltisinde tutulur. Weighert's çalışma çözeltisi: Stok A ve stok B çözeltileri eşit hacimler alınarak karıştırılarak hazırlanır.	
6	Kesitler 10 dakika akar suda yıkanır.	
7	Kesitler distile su ile yıkanır.	
8	Biebrich Scarlet-Asit fuksin çözeltisi içinde 15 dakika tutulur.	
9	Kesitler distile su ile çalkalanır.	
10	Fosfomolibdik asit-fosfotungstik asit çözeltisinde 15 dakika tutulur.	
11	Kesitler direk olarak (yıkanmadan) anilin mavisi çözeltisi içine alınır ve 5 dakika boyanır.	
12	Kesitler distile su ile çalkalanır.	
13	Asetik asit çözeltisinde 1 dakika tutulur.	
14	Kesitler distile su ile çalkalanır.	
15	Kesitler 1 dakika % 80 alkol içinde tutulur.	
16	Kesitler 1 dakika % 95 alkol içinde tutulur.	
17	Kesitler 1 saat ksilende tutulur.	
18	Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır ve penset yardımıyla hava kabarıkları çıkarılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-15

PERİODİK ASİT SCHIFF (PAS) BOYAMA PROTOKOLÜ

Gerekli Malzemeler : Lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler, kapaklı cam kaplar, etil alkol (% 60, 70, 80, 90, 95), ksilen, cam mezür, distile su, PAS boyama kiti- (ADR 0506016), lamel, entellan, penset, lam asansörü, etüv.

	Basamaklar	Gözlem
1	Deparafinizasyon işlemi için, parafin bloktan lama alınmış 5 µm'lik örnek kesitler lam asansörüne yerleştirilerek 60°C'lik etüvde 1 gece bekletilir.	
2	Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 30'ar dakika 2 değişim ksilende tutulur.	
3	Rehidratasyon işlemi için, % 95, % 80, % 70 etil alkol serilerinde 2'şer dakika tutulur.	
4	Kesitler 5 dakika distile su ile yıkanır.	
5	Kesitler Periyodik asit solüsyonu içinde 5 dakika tutulur.	
6	Kesitler distile su ile yıkanır.	
7	Kesitler Schiff reaktifi içinde 15 dakika tutulur.	
8	Kesitler akar su altında 10 dakika yıkanır.	
9	Kesitler Hematoksilen Gill 3 çözeltisi içinde 6 dakika tutulur.	
10	Kesitler akar su altında 10 dakika yıkanır.	
11	Kesitler diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarılır.	
12	Kesitler akar su altında 10 dakika yıkanır.	
13	Kesitler 1 dakika % 80 alkol içinde tutulur.	
14	Kesitler 1 dakika % 95 alkol içinde tutulur.	
15	Kesitler 1 saat ksilende tutulur.	
16	Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatılır ve penset yardımıyla hava kabarıkları çıkarılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-16

PARAFİN KESİTLERDE İNDİREK İMMUNOHİSTOKİMYA
YÖNTEMİ

Gerekli Malzemeler : Polilizinle kaplı lam, lamel, pipetör, şale, kapalı kutu, fosfat tampon solüsyonu (PBS), Fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini (PBS-BSA), Primer antikor, Sekonder antikor kiti, Diamino benzdin solüsyonu (DAB), Distile su, Mayer'in Hematoksileni, kapatma medyumunu, sınırlayıcı kalem

	Basamaklar	Gözlem
1	Kesitler, bir gece 60°C etüvde tutulur.	
2	Kesitler soğuduktan sonra 2X30 dk ksilende tutulur.	
3	Gerekli bilgiler lamın üzerine kurşun kalemle yazılır.	
4	Kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lik etil alkolde 2'şer dk tutulur.	
5	Kesitler distile su ile 10 dk yıkanır.	
6	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
7	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır.	
8	Kullanılacak antikor için önerilen antijen "retrival" yöntemi uygulanır.	
9	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
10	Endojen peroksit blokajı yapılır (% 3 H ₂ O ₂) (5 dakika).	
11	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
12	Kesitler üzerine Blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenir.	
13	Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırılır ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 1 saat oda ısısında bekletilir.	
14	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
15	Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletilir.	
16	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
17	Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletilir.	
18	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
19	DAB solüsyonu damlatılır, 10-15 dk kapalı nemli kutuda	

	bekletilir.	
20	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
21	Distile su ile yıkanır.	
22	Mayer'in hematoxileni ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 1-5 dk boyama yapılır.	
23	Distile su ile yıkanır.	
24	Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 1'şer dakika bekletilir.	
25	Kesitler kurduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilende şeffaflştırılır.	
26	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kesitler kapatılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-17

PARAFİN KESİTTE TUNEL BOYAMA YÖNTEMİ

Gerekli Malzemeler : Polilizinle kaplı lam, lamel, pipetör, şale, kapalı kutu, fosfat tampon solüsyonu (PBS), ChemiconTUNEL kiti , Diamino benzidin solüsyonu (DAB), Distile su, Mayer'in Hematoksileni, kapatma medyumunu, sınırlayıcı kalem

	Basamaklar	Gözlem
1	Kesitler, bir gece 60°C etüvde tutulur.	
2	Kesitler soğuduktan sonra 2X30 dk ksilende tutulur.	
3	Gerekli bilgiler lamın üzerine kurşun kalemle yazılır.	
4	Kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lik etil alkolde 2'şer dk tutulur.	
5	Kesitler PBS ile 5 dk yıkanır.	
6	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
7	Kesitler 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu ile 15 dk oda sıcaklığında tutulur.	
8	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
9	Endojen peroksit blokajı yapılır (% 3 H ₂ O ₂) (5 dakika).	
10	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
11	Equilibration tampon solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında yıkanır.	
12	Her kesit için 100 µl TdT solüsyonu hazırlanarak (77 µl reaksiyon tampon solüsyonu + 33 µl TdT), kesitler üzerine damlatılır.	
13	TdT konmuş kesitler üzerine plastik lamel konularak 37°C'de 1 saat bekletilir.	
14	Reaksiyon durdurma tampon solüsyonu hazırlanarak (1 ml Stop washing buffer + 34 ml distile su) 10 dk oda sıcaklığında yıkanır.	
15	Anti-digoxigenin konjugatı ile 30 dakika oda ısısında bekletilir.	
16	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
17	DAB solüsyonu damlatılır, 5-10 dk kapalı nemli kutuda bekletilir.	
18	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
19	Distile su ile yıkanır.	

20	Mayer'in hematoksileni ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 1-5 dk boyama yapılır.	
21	Distile su ile yıkanır.	
22	Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 1'şer dakika bekletilir.	
23	Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilende şeffaflştırılır.	
24	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kesitler kapatılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-18

DONMUŞ (FROZEN) BLOKLARDAN KESİT ALMA

Gerekli Malzemeler : Kriyostat, donmuş blok, distile su, polilizinle kaplı lam, frozen gömme materyali (OCT), PBS, -22°C / -25 °C buzdolabı, silika jel, kesit saklama kutusu

	Basamaklar	Gözlem
1	Kriyostat bir gün önceden açılır ve derecesi -22°C / -25 °C olacak şekilde ayarlanır.	
2	%4'lük paraformaldehit ile tespit edilmiş veya tespit edilmemiş doku örneği alınır.	
3	Doku tespit edilmiş ise PBS ile 2x30 dk, tespit edilmemiş ise PBS ile bir kez yıkanır.	
4	Kriyostat içinde, frozen blok tutucusu üzerine 1 damla OCT damlatılır	
5	Doku kesit alınacak yüzü yukarıda olacak şekilde OCT üzerine yerleştirilir.	
6	Üzeri tamamen OCT ile kaplanır ve 30 dk -22°C / -25 °C'de donması için beklenir.	
7	Blok tutucusu kriyostat üzerindeki yerine yerleştirilir.	
8	Bıçak kesit yüzeyi ile kesitin alınacağı aparatın kenarı paralel olacak şekilde ayarlanır.	
9	OCT'nin fazlası doku örneği gelinceye kadar trimlenerek uzaklaştırılır.	
10	Doku örneğinden 7-10 µm kalınlığında kesitler alınır.	
11	Kesit alınan aparatın üzerindeki kesitler lam üzerine alınır.	
12	Lamlar üzerine gerekli bilgiler yazılır.	
13	Kesitler kullanılmaya kadar silika jel konmuş kutularda -22°C-25 °C de saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-19

DONMUŞ KESİTLERDE İNDİREK İMMUNOHİSTOKİMYA
(FLORESAN)

Gerekli Malzemeler : Kaplı lam, lamel, pipetör, pipet ucu, şale, kapalı kutu, aseton, fosfat tampon solüsyonu (PBS), fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini (PBS-BSA), primer antikor, floresan işaretli sekonder antikor, propidium iodide, su bazlı kapatma maddesi, sınırlayıcı kalem

	Basamaklar	Gözlem
1	Kesitler, saf asetonunda, oda ısısında 10 dk tespit edilir.	
2	60 dk kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
3	Gerekli bilgiler lamın üzerine yazılır.	
4	Uygun şekilde dilüsyonu yapılmış primer antikorlar kesitlere damlatılır, kapalı nemli kutuda 1 saat oda ısısında tutulur.	
5	PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkanır.	
6	Kesitlerin üzerine hazırlanmış olan floresan işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletilir.	
7	PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkanır.	
8	Propidium iodide kesitler üzerine damlatılır.	
9	PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkanır.	
10	Su bazlı kapatma medyumu kullanılarak kesitler lamel kapatılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-20

**DONMUŞ KESİTLERDE İNDİREK İMMUNOPEROKSİDAZ
YÖNTEMİ**

Gerekli Malzemeler : Polilizinle kaplı lam, lamel, pipetör, pipet ucu, şale, kapalı kutu, aseton, fosfat tampon solüsyonu (PBS), fosfat tampon solüsyonu-sığır serum albumini (PBS-BSA), primer antikor, sekonder antikor kiti, diamin benzidin solüsyonu (DAB), serum fizyolojik (SF), Mayer'in hematoksileni, etil alkol, ksilol, kapatma maddesi, sınırlayıcı kalem

	Basamaklar	Gözlem
1	Kesitler, saf asetonunda, oda ısısında 10 dk tespit edilir.	
2	60 dk kurutulduktan sonra kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
3	Gerekli bilgiler lamın üzerine yazılır.	
4	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
5	Endojen peroksit blokajı yapılır (% 3 H ₂ O ₂) (5 dakika).	
6	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
7	Kesitler üzerine Blok solüsyonu (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenir.	
8	Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırılır ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 1 saat oda ısısında bekletilir.	
9	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
10	Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletilir.	
11	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
12	Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletilir.	
13	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
14	DAB solüsyonu damlatılır, 10-15 dk kapalı nemli kutuda bekletilir.	
15	PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkanır	
16	Distile su ile yıkanır.	
17	Mayer'in hematoksileni ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 1-5 dk boyama yapılır.	
18	Distile su ile yıkanır.	

19	Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 1'şer dakika bekletilir.	
20	Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilende şeffaflştırılır.	
21	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kesitler kapatılır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-21

KALIN VE İNCE KESİT İÇİN BIÇAK HAZIRLANMASI

Gerekli Malzemeler : Cam şerit, bıçak yapıcı makine, süzgeç kağıdı, yapışkan band

	Basamaklar	Gözlem
1	Cam şeritler, musluk suyu ve sabun ile yıkanır.	
2	Cam şeritler, distile su ile yıkanır	
3	Cam şeritler, süzgeç kağıdına sarılarak kurutulur.	
4	Temiz ve kuru cam şeritler bıçak yapıcıya konup sıkıştırılır.	
5	Tungsten karbid ya da elmas ayak ile çizilir.	
6	Hafif basınç uygulanarak kırılır. 25x25 mm kare cam parçalar oluşturulur.	
7	Kare cam parçaları 45° döndürülerek yerleştirilip, sıkıştırılır.	
8	Tungsten karbid ya da elmas ayak ile işaretlenir/çizilir.	
9	Hafif basınç uygulanarak kırılır.	
10	Üçgen biçiminde iki bıçak elde edilir.	
11	Bıçakların uçları değerlendirilir.	
12	Yapışkan band, bıçağın kullanılacak ucuna bir kenarına yapıştırılır, bıçağın alt kenarına paralel olacak şekilde düzgün U biçiminde döndürülerek bıçağın diğer kenarına yapıştırılır.	
13	Artan band keskin bisturi ile bıçak ucuna değmeden kesilir.	
14	Bandın altında kalan boşluk oje ile doldurularak kapatılır.	
15	Toz geçirmeyen kapaklı kutularda saklanır.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-22

KALIN KESİT ALMA

Gerekli Malzemeler : Cam bıçak, araldit ya da epon blok, ultra mikrotom, lam, hot plate, Metilen mavisi-Azur II solüsyonu, distile su, penset, pastör pipeti veya enjektör, lamel

	Basamaklar	Gözlem
1	Polimerize olmuş araldit ya da epon blok, blok tutucuya (holder) yerleştirilir.	
2	Blok tutucu, mikrotoma yerleştirilir.	
3	Cam bıçak, bıçak tutucuya yerleştirilir.	
4	Blok yüzü ve bıçak kenarı birbirine paralel olacak şekilde ayarlanır.	
5	Bloğun ucunda bulunan fazla araldit ya da epon 2-5 µm kalınlığında kesitler alınarak uzaklaştırılır.	
6	Lamin üzerine 1 damla distile su konur.	
7	Alınan 1-2 µm kalınlığında kesit, distile su damlasının üzerine penset yardımıyla alınarak bırakılır.	
8	Lam 70-80°C hot plate'de kaynatılmadan su damlası tamamen buharlaşana kadar ısıtılır.	
9	Isı ile kesitler düzleştirilir ve kurutularak lama sıkıca yapıştırılır.	
10	Kesitin üzerine 1 damla Metilen mavisi-Azur II solüsyonu damlatılır.	
11	70-80°C hot plate'de yaklaşık 1 dakika bekletilir.	
12	Musluk suyu ile yıkanır.	
13	Kapatma medyumunu damlatılarak lamel ile kapatılır	
14	Kesitler ışık mikroskopunda incelenir.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-23

MESA

Gerekli Malzemeler : Cam bıçak, araldit yada epon blok, ultra mikrotom


	Basamaklar	Gözlem
1	Kalın kesitler ışık mikroskobunda incelenir ve elektron mikroskop (EM) incelemesi için uygun alan belirlenir.	
2	Blok, ultra mikrotomdaki blok tutucuya yerleştirilir.	
3	Blok yüzü aydınlatılarak EM'de incelenecek alan (mesa yapılacak alan) ışık mikroskobundaki görüntüsü ile eşleştirilir.	
4	Cam bıçak blok yüzüne paralel olarak yerleştirilir.	
5	Cam bıçağın ucu, bloğa paralel olacak şekilde istenen bölgenin sınırına gelene kadar ayarlanır.	
6	Fazla araldit ya da epon 1 µm kalınlığında kesitler alınarak uzaklaştırılır.	
7	Blok 90° döndürülür.	
8	İstenen bölgenin etrafındaki dört kenara 4-7. basamaklar uygulanır.	
9	Blok yüzü kare veya dikdörtgen biçimine gelir.	
10	Bloğun alt ve üst kenarlarının birbirine paralel olmasına dikkat edilir.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-24

TRİMLEME

Gerekli Malzemeler : Cam bıçak, ultra mikrotom, blok, mikroskop

	Basamaklar	Gözlem
1	Kalın kesitler ışık mikroskobunda incelenir, elektron mikroskop (EM) incelemesi için uygun alan belirlenir.	
2	Blok, mikrotom üzerindeki blok tutucuya yerleştirilir.	
3	Blok yüzü aydınlatılarak EM'de incelenecek alan (trimlenecek alan) ışık mikroskobundaki görüntüsü ile eşleştirilir.	
4	Cam bıçak yan açısı 45-50°'ye ayarlanır.	
5	Fazla araldit ya da epon 2-5 µm kalınlığında kesitler alınarak incelenecek alanın sınırına kadar kesilir.	
6	Blok 90° döndürülür.	
7	Bloğun dört kenarı için 4-6. basamaklar tekrarlanır.	
8	Blok yüzü  biçimine getirilir.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi

İNCE KESİT ALMA-25

Gerekli Malzemeler : Havuzlu cam bıçak, blok, penset, ultramikrotom, distile su, enjektör, ksilen, sulu boya fırçası, grid, içinde kurutma kağıdı olan kapaklı petri kutusu, grid kutusu

	Basamaklar	Gözlem
1	Ultramikrotomda havuzlu bıçak, bıçak tutucuya takılır ve ucu kontrol edilir.	
2	Trimlenmiş blok, blok tutucuya takılır ve ultramikrotoma yerleştirilir.	
3	Blok yüzü ve bıçak ucu tamamiyle birbirine paralel yapılır.	
4	Bıçağın havuzu uygun şekilde distile su ile doldurulur.	
5	Kontrol paneli açılır, kesit kalınlığı ve aralığı ayarlanır.	
6	70 nm kalınlığında alınan seri kesitlerin havuza düşmeleri sağlanır.	
7	Havuzdaki kesitler ksilene batırılmış fırça ile ksilen buharına tutularak düzeltilir.	
8	Kesit için uygun seçilen grid penset ile tutulur.	
9	Havuzdaki açık sarı, gümüş rengi kesitler, penset ile tutulan gridin mat yüzüne alınır.	
10	Gridler petri kutusu içindeki kurutma kağıdının üzerine bırakılarak, kurutulur.	
11	Kurutulan gridler toz geçirmeyen kutularda saklanır ve deftere not edilir.	

TÜRK HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ DERNEĞİ
SINAV KOMİSYONU
NESNEL YAPILANDIRILMIŞ UYGULAMA SINAVI

Öğrenim Rehberi-26

TRANSMİSYON ELEKTRON MİKROSKOBİ İÇİN
KESİT BOYAMA

Gerekli Malzemeler : Eldiven, penset, parafilm, petri kutusu, alüminyum folyo, uranil asetat, kurşun nitrat, sodyum sitrat, 1 N NaOH, enjektör, mikrofiltre, distile su, filtre kağıdı, özel atık kabı, grid kutusu.

	Basamaklar	Gözlem
1	Eldiven giyilir.	
2	Parafilm banko üzerine serilir.	
3	5 gr Uranil asetat 100 ml metanol ile eritilir ve süzülür.	
4	Enjektör haznesine uranil asetat solüsyonu çekilerek, mikrofiltre takılır.	
5	Petri kutusu içinde uranil asetat damlacıklarını oluşturulur.	
6	Üzerinde kesit bulunan grid pensetle tutularak kutudan alınır.	
7	Uranil asetat damlacığının içine, kesitleri içeren yüzü aşağıya gelecek şekilde ters olarak konur.	
8	Petri kutusunun kapağı kapatılır.	
9	15-20 dakika boyanması için beklenir.	
10	Yeni bir parafilm banko üzerine serilir.	
11	Bir dizi distile su damlacıkları oluşturulur.	
12	Gridi penset yardımıyla uranil asetat solüsyonu içinden alınır.	
13	İlk distile su damlacığına ters olarak batırılır ve sırayla tüm damlacıklardan geçirilerek yıkanması sağlanır.	
14	Gridin kesit olmayan yüzünü filtre kağıdına değdirerek kurutulur.	
15	1,73 gr sodyum sitrat, 1,33 gr kurşun nitrat, 30 ml distile su içerisinde eritilir. Çalkalanarak karıştırılır.	
16	Solüsyona 8 ml 1 N NaOH ilave edilir.	
17	Distile su ile 50 ml'ye tamamlanır ve filtreden geçirilir.	
18	Petri kutusu içinde boya damlacıkları oluşturulur.	
19	Grid pensetle tutularak, kurşun sitrat damlacığının içine ters olarak konur.	
20	Petri kutusunun kapağı kapatılır.	

21	15 dakika boya içinde bekletilir.	
22	Yeni bir parafilm banko üzerine serilir.	
23	Bir dizi distile su damlacıkları oluşturulur.	
24	Gridi penset yardımıyla kurşun sitrat solüsyonu içinden alınır.	
25	İlk distile su damlacığına ters olarak batırılır ve sırayla tüm damlacıklardan geçirilerek yıkanması sağlanır.	
26	Gridin kesit olmayan yüzünü filtre kağıdına değdirerek kurutulur.	
27	Grid kutusuna yerleştirilir ve deftere yazılır.	
28	Kullanılmış malzemeyi uygun şekilde özel atık kabına konarak ortadan kaldırılır.	