

Sejtenyésztési alapismeretek

1. Bevezetés

A sejteknek ún. sejtkultúrákban történő tenyésztése (a sejteket az eredeti helyükről eltávolítva *in vitro* tartjuk fenn ill. szaporítjuk) és tanulmányozása több szempontból előnyös:

- Míg a legtöbb állati (és természetesen növényi) szerv illetve szövet több különböző sejttípusból épül fel, addig a sejtkultúrákban lehetőség nyílik az egyes specifikus sejt fajták szeparáltan történő tenyésztésére, amely a tulajdonságaikat tekintve sokkal homogénebb sejt populációt eredményez.
- A kísérleti körülmények kontrollálása sejtkultúrák esetén könnyebben megoldható, mint intakt organizmusok esetén. (Pl. a növekedési körülmények manipulálásával viszonylag egyszerűen vizsgálható a különböző növekedési faktorok hatása az adott sejttípusra.)
- A szervekben, szövetekben nehéz elkülöníteni a sejtek „saját” tulajdonságait a többi, ott jelenlévő sejttípussal való kölcsönhatásából következő sajátságoktól; sejtkultúrák esetén ez nem jelent problémát.
- Sok esetben akár egyetlen sejtből is könnyen kifejlődhet egy genetikailag homogén sejt populáció, ami egyszerűbbé teszi a genetikailag különböző sejtek elkülönítését és vizsgálatát.

Nemcsak sejtek, hanem szervek illetve szövetek is tenyészthetők *in vitro* körülmények között, ilyenkor beszélünk szerv- ill. szövetkultúráról. Miután a sejtbiológia gyakorlatok során kizárólag sejtkultúrákkal találkozunk, a jegyzetben ezek tárgyalására szorítkozunk.

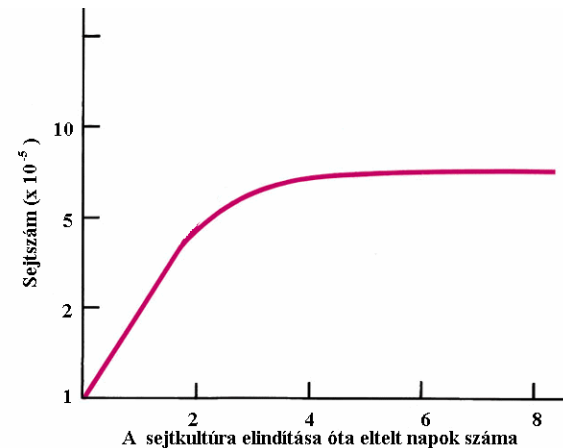
A továbbiakban néhány, a sejtenyésztésben alkalmazott alapfogalommal ismerkedünk meg:

- primér (elsődleges) ill. szekunder (másodlagos) kultúra: az eredeti szervből, szövetből frissen eltávolított sejtekből illetve azok egyszeri átoltása (passzálása) révén készült kultúra;

- sejttörzs: a primer kultúrából néhány passzálás után kialakult, véges élettartamú (kb. 40-50 passzálás) sejtkultúra;
- sejtvonal: genetikailag viszonylag homogén, megfelelő körülmények között korlátlan ideig fenntartható sejtkultúra. A legtöbb esetben vagy normál sejtek *in vitro* (kultúrában történő) transzformációjával (retrovirális transzdukciós onkogén-transzfekeció révén) vagy tumor sejtek (amelyek a normál sejtek szervezeten belül transzformált változatának tekinthetők) felhasználásával nyerik a sejtvonalakat.
- a sejtkultúrákat alkotják szuszpenzióban illetve letapadva növekvő sejtek. Ez utóbbi esetben a sejtek mátrix fehérjét termelnek és ezek, valamint a tápoldatban jelenlévő Ca^{2+} ionok segítségével szorosan kitapadnak a tenyésztő edény falához, ún. egyrétegű (monolayer) kultúrát alkotnak.

2. A sejtkultúrák fenntartása

Az *in vitro* sejtenyésztés során a sejteket a fiziológiást közelítő körülmények között, azaz megfelelő tápoldatban (médium), 37 °C-on inkubáljuk. Az 1. ábrán egy, a sejtvonalakra jellemző növekedési görbét láthatunk szemilogaritmikus ábrázolásban.



1. ábra

Láthatjuk, hogy a kultúrát egy adott sejtsűrűséggel indítva a sejtek száma egy ideig exponenciálisan nő, majd eléri egy ún. telítési szakaszt, ahol a sejtek az osztódást

befejezik (G_1/G_0 fázisban vannak), a sejtszám nem változik tovább. Általában ebben a stádiumban történik a sejtek passzálása: ekkor a sejteket friss médiummal „meghígítjuk”, azaz olyan koncentrációban vesszük fel őket, amelynél újból képesek az osztódásra.

A passzálás több módon történhet:

- szuszpenzióban növő sejtek: sokszor elegendő, ha a sejtuszuszpenziót a friss médiummal egyszerűen a kívánt arányban meghígítjuk. Másik lehetőség, hogy a szuszpenzió lecentrifugálása és a felülúszó (régi médium) eltávolítása után a megfelelő mennyiségű friss tápoldatban vesszük fel a sejteket.
- letapadó sejtek: ezek passzálása általában akkor történik, amikor a sejtek már az egész rendelkezésükre álló felületet benőtték (konfluens kultúra). A kitapadó sejteket passzálás előtt szuszpenzióba kell vinni, ez néhány esetben a tenyésztő edény egyszerű rázásával, ütögetésével elérhető, de legtöbbször enzimekre (proteázok - a kitapadást okozó mátrix fehérjék proteolitikus hasításához) vagy kelátképző anyagokra (a kitapadáshoz szükséges kétértékű ionok megkötéséhez) van szükség. Leggyakrabban a tripszin nevű enzimet használják, sokszor együtt alkalmazzák EDTA-val (etilén-diamin-tetraacetát – kelátképző anyag). (Előfordul a kollagenáz enzim használata is.) A tripszinezés során a megfelelő pufferben elkészített tripszinoldatot ráöntik a letapadt sejtekre (a médium előzetes eltávolítása és a sejtek PBS-sel történő leöblítése után), majd 1-2 percig $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubálják őket. Ezután friss médium hozzáadásával leállítják a reakciót (a médium szérumtartalma ui. leállítja a tripszint), a sejteket lefugálják és a kívánt mennyiségű friss médiumban veszik fel.

A szuszpenzióba vitt sejteket a passzálás előtt meg kell számolni. A sejtyszámolás alapelveivel illetve az élő/elpusztult sejtek megkülönböztetésére használatos módszerekkel több gyakorlat leírása során is találkozhatnak, ezért ennek tárgyalására most nem térünk ki.

A sejtek passzálása során két dologra feltétlenül ügyelnünk kell: minden lépést steril körülmények között kell elvégeznünk, hogy elkerüljük a sejtenyészetek mikrobiális fertőzését; illetve a többféle sejtet is fenntartó laboratóriumokban a sejtek közötti

kontamináció elkerülése végett a steril fülkében egyidőben csak egyféle sejtet szabad dolgozni.

3. A sejt kultúrák fenntartásához szükséges anyagok és eszközök

3/a. Tápfolyadék (médium)

A médium feladata, hogy a sejtek számára biztosítsa a növekedéshez szükséges tápanyagokat, növekedési faktorokat, a megfelelő fizikai és kémiai környezetet. A tápoldat ideális összetétele sejt típusonként különböző lehet az adott sejt sajátosságainak megfelelően. A következőkben felsoroljuk a tápoldatokban szereplő alkotóelemeket:

- sóoldat: biztosítja a nélkülözhetetlen anorganikus ionokat (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , foszfát, hidrogénkarbonát), fenntartja az ozmolalitást;
- glükóz: energiaforrás, felhasználható a szénhidrátok, lipidek, nukleinsavak valamint a szerin, az alanin és a glicin szintézisére;
- esszenciális aminosavak (arginin, hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, treonin, triptofán és valin): ezeket az aminosavakat a gerincesekből származó sejtek nem tudják előállítani, ezért a tápoldatnak kell számukra biztosítani őket. A felsorolt tíz esszenciális aminosavon kívül a legtöbb sejt kultúra igényli a glutamin, tirozin és cisztein jelenlétét is. Ezeket az aminosavakat általában specializált sejtek termelik az eredeti szervezetben
- vitaminok: kolin, folsav, nikotinamid, inozitol, pantoténsav, piridoxin, riboflavin, tiamin, biotin, B_{12} (és néhány zsírolékony vitamin, de ez utóbbiakat a tápfolyadék egyéb összetevői tartalmazzák a megfelelő mennyiségben).
- pufferrendszer a pH fenntartásához: a médium pH-ját általában oldott CO_2 /bikarbonát puffer segítségével tartják fenn, ekkor az oldott CO_2 szintet az CO_2 nyomás megfelelő beállításával szabályozzák. (Alternatív lehetőség a 20 mM-os HEPES puffer, de ez kismértékben toxikus, ezért ritkábban alkalmazzuk).
- fenolvörös: a sejtek metabolizmusuk során savas vegyhatású anyagokat (pl. tejsav) termelnek, amelyek az alkalmazott pufferek ellenére egy adott szint

felett jelentősen megváltoztathatják a tápfolyadék pH-ját, ami sejtkárosodást okozhat. A pH ellenőrzésére alkalmazzuk a fenolvörös indikátort, amely savas közegben sárga, lúgos közegben lila színű. Ha a médium megsavanyodik, akkor cserélni kell a tápoldatot. Ha az indikátor hosszabb inkubáció után is lila marad, akkor az azt jelenti, hogy a sejtek valamilyen ok folytán nem növekednek megfelelő mértékben.

- szérum: a legtöbb sejtípus esetén 5-20 % foetális (magzati, pl. fetal calf serum (FCS) – foetalis borjú szérum) vagy felnőtt szérummal egészítik ki a médiumot. A szérum számos olyan faktort tartalmaz, amely nélkülözhetetlen a sejtek kultúrában történő proliferációjához (pl. inzulin – a legtöbb gerinces sejt növekedéséhez szükséges). Néhány sejtípus szérummentes médiumban is fenntartható, de a megfelelő növekedési faktorokat és egyéb komponenseket (pl. inzulin, transferrin, szelén) ekkor is biztosítani kell a sejtek számára.
- antibiotikumok (penicillin, streptomycin, gentamycin): a bakteriális fertőzések ellen véd.

3/b. Steril fülke

A szűrt levegővel ellátott steril fülke (laminar box; laminar air flow cabinet) lehetőséget ad arra, hogy a sejtenyésztéssel illetve a médiummal kapcsolatos manipulációkat steril környezetben tudjuk elvégezni. A fülkékben megfelelően szűrt levegőt (a 0.3 µm-nél nagyobb részecskéket szűrik ki, így pl. a legtöbb baktériumot illetve gomba spórát) áramoltatnak a munkafelület fölé, így a kontamináció veszélye csökken. Emellett a levegő áramoltatása a sejtek kezelése közben képződő aeroszolt is gyorsan eltávolítja. A steril fülkékben a gáz-, víz- és elektromos csatlakozást biztosítani kell.

A steril fülkék számos konfigurációban elérhetők, ezek méretükben és a levegőáram irányában változhatnak. Nemcsak a sejteket védik meg a fertőzésektől, de – tervezésüktől függően – a felhasználó számára is különböző szintű védeltséget biztosítanak, emiatt kiválasztásuknál azt is figyelembe kell venni, hogy milyen, az egészségre mennyire veszélyes sejt kultúrákkal foglalkoznak bennük.

A steril fülkéket gyakran UV lámpával (germicid) is felszerelik, ami segít fenntartani a sterilitást. Ilyen esetekben figyelni kell arra, hogy a fülke használata közben az UV lámpa ne működjön.

3/c. Inkubátor

A sejtenyésztésben alkalmazott inkubátorokkal szembeni fő elvárás, hogy a bennük tartott sejt kultúrák számára az optimális növekedési hőmérsékletet biztosítsák (emlős sejt vonalak esetén ez általában 37 °C). A legtöbb esetben állandó parciális nyomású CO₂ atmoszférát valamint megfelelő páratartalmat is biztosítaniuk kell. A hőmérséklet és a CO₂ tartalom (általában 5 %) szabályozása általában elektromos úton történik.

A megfelelő páratartalmat legtöbbször steril víznek az inkubátorba helyezésével és azon steril CO₂ átbuborékoltatásával biztosítják.

3/d. Mikroszkóp

A sejtenyésztetek mikroszkóppal (invert mikroszkóp – a sejtek közvetlenül a tenyésztő edényben vizsgálhatók) történő megfigyelése a napi rutinfeladatok közé tartozik. Így nyomon követhető a sejtek növekedési üteme, még korai stádiumban felfedezhetők az esetleges problémák (pl. fertőzések). A mikroszkópokról egy külön fejezet található a gyakorlati jegyzetben, ezért ezek ismertetésétől most eltekintünk.

3/e. Egyéb eszközök

- sejtenyésztő edények: általában műanyagból (ritkábban üvegből) készülnek. Míg szuszpenzióban növekvő sejtek esetén ugyanaz az edény többszöri passzáláshoz is felhasználható, addig letapadó sejteknél minden egyes passzáláskor újabb edényt érdemes használni (bár az üvegből készült tenyésztő edényeket letapadó sejteknél is többször felhasználhatjuk).
- centrifuga: a sejtek mosásához, töményítéséhez illetve ülepítéséhez használjuk.
- üveg vagy műanyag pipetták, automata pipetták; centrifugacsövek stb.
- steril szűrők, sterilizáló berendezések: a tápfolyadék illetve az alkalmazott eszközök sterilizálására használják.

- vízfürdő: a médiumok, oldatok megfelelő hőmérsékletének beállításához (általában 37 °C).

4. A steril munkavégzés szabályai

- A sejtlaboratóriumi munkavégzés során mindig viseljük lehetőleg erre a célra rendszeresített köpenyt.
- A munka megkezdése előtt és befejezése után mindig alaposan mossunk kezet. Az egészségre veszélyes sejt kultúrák esetén viseljük kesztyűt.
- Használat előtt és után illetve különböző fajtájú sejtek kezelése között a munkafelületet mossuk le 70 %-os alkohollal. A felület lemosása a fülke belsejéből kifelé történjen.
- A médiumot illetve a különböző oldatokat tartalmazó üvegeket mossuk le alkohollal, mielőtt a fülkébe tesszük őket.
- Használat előtt ellenőrizzük a steril eszközöket tartalmazó csomagolás épségét.
- Vigyázzunk arra, hogy a nyitott edények felett ne nyúljunk át, hogy se az edények szája, sem az alkalmazott egyéb eszközök (pl. pipetták) ne érjenek hozzá semmihez.
- A még nagyobb biztonság érdekében az üvegpipetták illetve az edények szája használat előtt gázlánggal „leégethető”.

A fent felsoroltakon kívül szigorú rendszabályok vonatkoznak a sejtlaboratóriumban napi, heti, havi stb. rendszerességgel elvégzendő takarítási és karbantartási feladatokra; a tápfolyadékok és egyéb oldatok valamint az alkalmazott eszközök sterilizálására is.

A fénymikroszkóp felépítése

A sejt „tökéletes” valóság-hű képe nem állítható elő, ezért nagyon fontos a különböző kulcsfontosságú sejtvizsgáló módszerek néhány tulajdonságának (az előállított kép tulajdonságainak és a módszer korlátjainak) megértése.

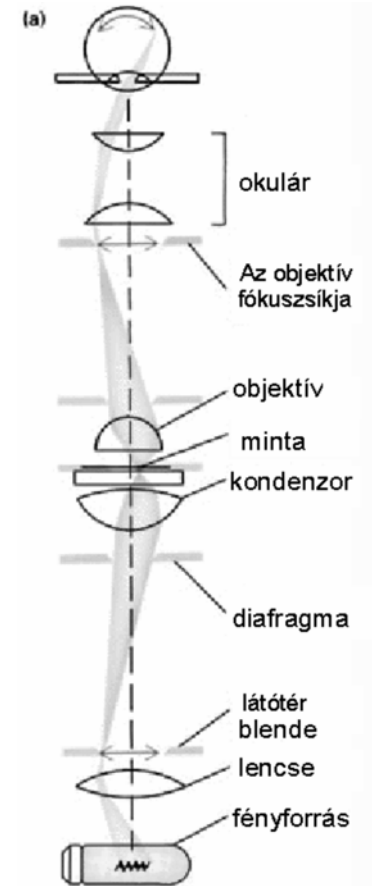
Az elektronmikroszkópos technika kidolgozása nagyban kiterjesztette azon képességünket, hogy láthatóvá tegyünk sejtalkotókat és nagyon sok információhoz jutottunk a növényi és állati sejtek szerkezetéről illetve a sejtalkotók szerveződéséről. A képek információtartalma elsősorban az alkalmazott fény- illetve elektronmikroszkóp tulajdonságaitól és a vizsgálatot megelőző preparációs eljárástól függ. Ezeket a technikákat a sejtek strukturális sajátosságainak vizsgálatára dolgozták ki. Habár a leghétköznapibb alkalmazása a fény és elektronmikroszkópnak a fixált, élettelen sejtekről származó minél több információ beszerzése, kritikus kérdés az eredmények értékelésekor, hogy mennyire vethető össze a vizsgálat előtt fixált, dehidrált esetleg megfestett preparátum az élő objektummal.

Fénymikroszkóp.

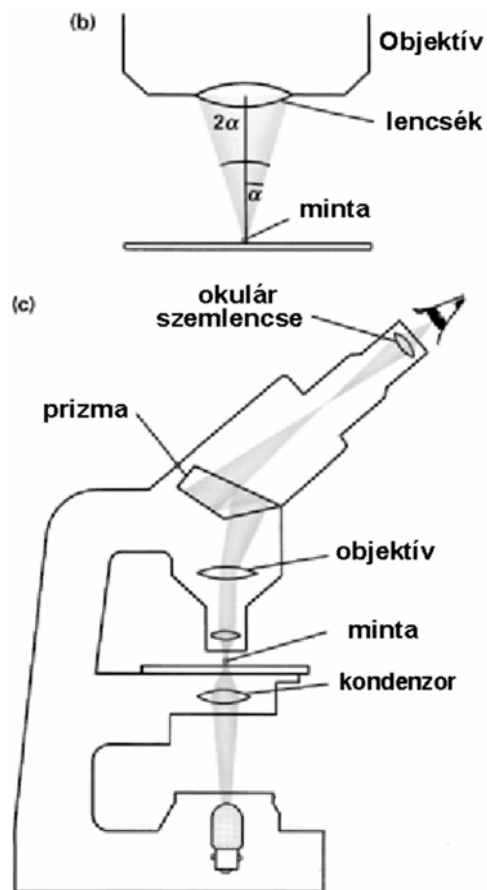
A fénymikroszkóp mely a legjobban elterjedt vizsgáló eszköz, számos, a mintáról származó kép megnagyítására szolgáló lencsét tartalmaz.

A mikroszkóp sugármenetét az 1. ábrán mutatjuk

be. Az átlátszó tárgylemezre applikált minta mozgatható tárgyasztalra van helyezve. A fényforrásból jövő fényt a kollektor és a kondenzor lencsék fókuszálják a mintára. Az



1. ábra



objektív gyűjti össze és fókuszálja a fókusz síkba a mintán áthaladt sugarakat. Így nagyított képet állít elő a mintáról. Ez a kép akár direkt módon is detektálható. Általában ezt a képet az objektív fókusz síkjába fókuszált szemlencse (okulár) segítségével tovább nagyítjuk. A szemlencse összegyűjti a már nagyított képről érkező sugarakat és az emberi szem vagy a fotólemez síkjába vetíti. A különböző diafragmák (látóterhatárolók) és rések a mintára érkező és az abból az észlelőig eljutó fény egyenletes eloszlását és élesen határolt látóteret biztosítanak. Az optikai leképezés egyik fontos paramétere a mintáról érkező fénysugár fél nyílásszöge α (2.b ábra).

A mikroszkópot általában két fontos paraméter jellemzi. Az egyik a teljes nagyítás, amely az egyes lencsék nagyításának szorzatából kapható meg. A másik,

2. ábra

talán ettől is fontosabb jellemző a mikroszkóp feloldóképessége, két közel levő pont

$$D = \frac{0.61\lambda}{N \sin \alpha}$$

megkülönböztetése. A mikroszkóp felbontása egyenlő D -vel, a két még megkülönböztethető pont távolságával. A kisebb szám nagyobb feloldásra utal. A D szám három paraméter függvényeként írható fel. Az apertúraszög α , vagy más néven a

mintára érkező fénysugár nyílásszögének fele, a lencse és a minta között levő közeg törésmutatója N és az alkalmazott fény hullámhosszának λ a függvénye.

A felbontás növelése az alkalmazott fény hullámhosszának csökkentésével vagy a törésmutató és az apertúra növelésével érhető el. Az $N \sin \alpha$ értéket numerikus apertúrának nevezzük.

A törésmutató megmutatja, hogy mennyire téríti el a közeg a fénysugarakat. Definíció szerint a levegő törésmutatója $N=1.0$. A törésmutató immerziós olajjal történő növelése az egyik lehetséges megoldás. Immerziós olaj alkalmazásával a minta és az objektív között a törésmutató 1.5-es értékre növelhető. Így a felbontás is 1.5 szeresére nő. Ilyenkor az alkalmazott fénysugarak jobban eltérülnek ha nagyobb törésmutatójú közegben haladnak át. Így kisebb felületről érkezik fény az objektívhez.

Ennek ellenére a fénymikroszkóp felbontási határa $0.2 \mu\text{m}$, bármikorára is nagyítjuk a tárgyról érkező képet. A fénymikroszkóp esetében ez azt jelenti, hogy csak azokat a tárgyreszleteket lehet leképezni, amelyeknek távolsága nagyobb néhány tized mikrométernél, másképpen a tárgy két, ennél a távolságnál kisebb távolságra levő pontja nem választható szét.

A felbontási limit kiszámolásakor szükségünk van a legjobb objektív apertúraszögének értékére ($\sin 70^\circ=0.94$), a látható tartományban még használható kék színű fény hullámhosszára ($\lambda=450 \text{ nm}$) és az alkalmazott immerziós olaj törésmutatójára ($N=1.5$)

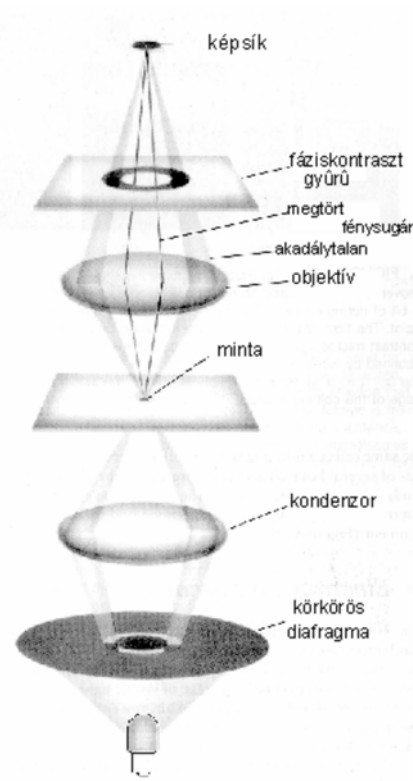
$$D = \frac{0.61 \cdot 450 \text{ nm}}{1.5 \cdot 0.94} = 194 \text{ nm}$$

A minta és az objektív között levegő esetén a fenti eredmény 292 nm körüli értéknek adódik. Kézenfekvő a lehetőség, hogy a hullámhossz további csökkentésével esetleg jobb eredményt lehetne elérni. A problémát néhány technikai nehézség okozza. A röntgen- vagy gammasugarak hullámhossza rövidebb, tehát kedvezőbb leképezési körülményeket kellene nyújtaniuk, de képképzésre nem alkalmazhatóak, mivel gyakorlatilag nincs számukra megfelelő tulajdonságokkal rendelkező törőközeg amellyel a sugarakat fókuszálni lehetne. Ilyen szempontból előnyösebbek az elektronsugarak.

Az elektromos kölcsönhatás tulajdonságait kihasználó elektronmikroszkóp (amelyet itt nem tárgyalunk részletesen) kidolgozása volt egy lépés ebbe az irányba. Az alkalmazott hullámtulajdonságokkal is rendelkező rövidebb hullámhosszúságú elektronnyaláb segítségével sikerült, természetesen rengeteg kompromisszum árán (minta preparáció nehézkes volta stb.) a feloldást növelni. Az elektronmikroszkópiás módszerek nagy, elvi hátránya a fénymikroszkópiákkal szemben, hogy a vizsgálat rendszerint olyan preparálási eljárásokat és vizsgálati körülményeket követel meg, amelyek igen távol állnak a természetes körülményektől. A vizsgálatok vákuumba helyezett, vízmentes, vezetőanyaggal bevont mintát igényelnek. Ezek a hátrányok halmozottan jelentkeznek biológiai, pl. sejttes rendszerek vizsgálatánál.

Fáziskontraszt mikroszkóp.

Az optikai technikák általában transzparens élő sejtekről szövetekről szolgáltatnak részletes információt. Általában kis vastagságbeli illetve törésmutatóbeli különbségeket alakítanak át intenzitáskülönbségekké. Az 3. ábrán látható fáziskontraszt mikroszkóp által létrehozott kép a törésmutató különbségekből származó információt tartalmazza. A fényforrásból érkező fény először egy körkörös diafragmán halad át melynek segítségével egy gyűrű alakú intenzitásprofil fókuszálódik a mintára. A minta belsejében a különböző törésmutatójú részeket elválasztó felületeken a fénysugár egy része sorozatos reflexiót és törést szenved. Az akadálytalanul, törést nem szenvedett fénysugár egy vastag szürke gyűrűn halad át a fázissíkon. A gyűrű a beérkező fénysugár egy részét abszorbeálja (intenzitását csökkenti) és az úthosszát (fázisát) negyed hullámhossznyival



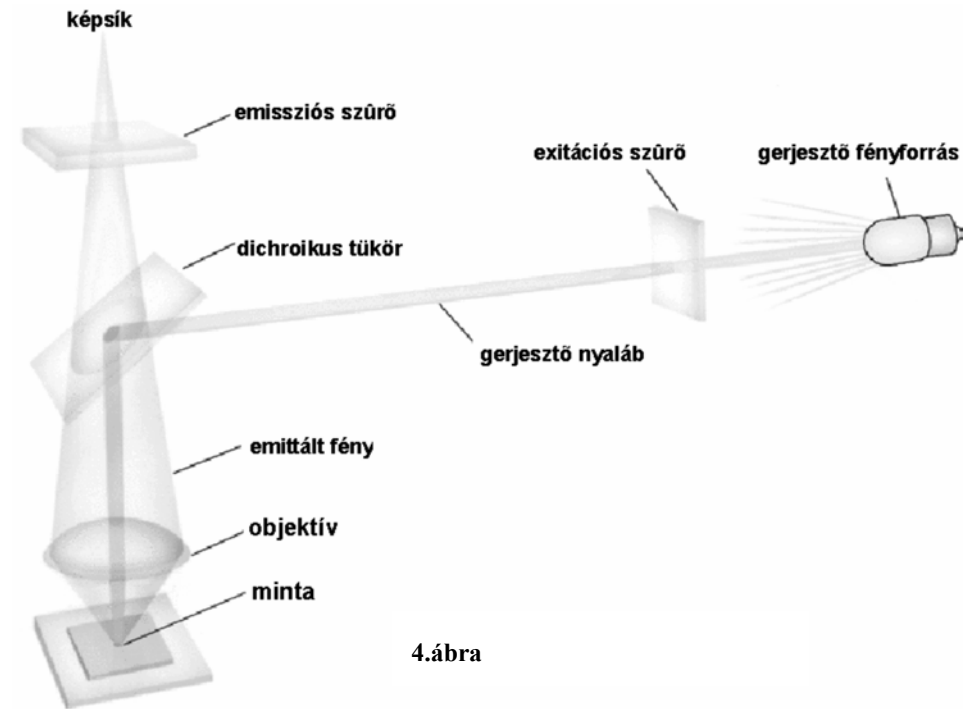
3. ábra

megváltoztatja. Amennyiben a mintán áthaladás során a fény diffrakciót szenved vagy megtörik akkor ezek a sugarak a fázissík vékony, átlátszó részén haladnak át. Így a kapott kép a különböző fázisú megtört és fénytörést nem szenvedett azonos intenzitású fénysugarak összegződéséből áll elő.

Fáziskontraszt mikroszkóp segítségével nagyobb sejtalkotók vizsgálatára van lehetőség.

Fluoreszcenciás mikroszkóp

Sejten belüli fehérjék lokalizálására a leghatékonyabb eszköz a kiválasztott fehérje



4. ábra

elleni specifikus antitestek és fluoreszcens mikroszkóp alkalmazása. A fluoreszcencia legegyszerűbb megfogalmazása amikor egy anyag abszorbeál egy adott hullámhosszú fényt (gerjesztési hullámhossz) majd kibocsát egy adott hosszabb hullámhosszú de még a látható tartományon belüli sugarat. A modern fluoreszcens mikroszkópok használatakor a minta által emittált fény segítségével állítunk elő képet. A fluoreszcens mikroszkóp felépítése látható a 4. ábrán. A sok hullámhossz komponens tartalmazó gerjesztő fény a fényforrást elhagyva egy optikai szűrőn halad át. A szűrőn a

fénynek csak az általunk kiválasztott hullámhosszúságú komponense halad tovább. Dikroikus tükör segítségével vetítjük, majd az objektívvel fókuszáljuk a mintára, gerjesztve vele a fluoreszcens festékkel jelölt molekulákat. Az emittált fluoreszcens fény az objektíven áthaladva hosszabb hullámhossza lévén nem reflektálódik a dikroikus tükrön, hanem áthalad és az emissziós tükröre érkeve a tükör blokkolja a gerjesztésből származó megmaradt komponenseket. A kapott képen csak a fluoreszcens molekuláktól származó emittált fluoreszcens fényt és a háttér intenzitást, az un. autofluoreszcenciát vizsgálhatjuk. Ezt az összeállítást mindig fáziskontraszt mikroszkóppal együtt alakítják ki, megkönnyítendő a fókuszálást és a minta beazonosítását.

Immunofluoreszcens technika alkalmazása során számos nehézséggel állunk szemben. A struktúra megőrzése érdekében alkalmazott fixálás sokszor roncsolja a fehérjéket, megváltoztatja az antigén-antitest kötődést stb. Ezen kívül a vékony metszetek készítésénél alkalmazott beágyazó anyag un. autofluoreszcenciája is befolyásolja a vizsgált antitestektől származó specifikus jelek tulajdonságait. Egy egész sejt mikroszkópos vizsgálata során a fókusz sík két oldaláról (alulról és felülről) is érkezik fluoreszcens fény a mintáról, így a megfigyelő a különböző mélységből érkező, különböző intenzitású komponensek szuperpozícióját detektálja. Így természetesen szinte lehetetlen az aktuális háromdimenziós elrendeződésről bármiféle információt nyerni.

A viszonylag nagy feloldású transzmissziós elektronmikroszkópos technikáknak is egyik nagy hátránya, hogy nagyon nehezen állítható elő jó minőségű háromdimenziós kép. Ezeket a problémákat a mintakészítés még fokozza (beágyazás, mechanikai szeletelés, stb.) A konvencionális optikai mikroszkópos technikáknál ez a mintakészítési probléma kiküszöbölhető, hiszen élő sejtek dinamikus tulajdonságai is vizsgálhatók. Az első kézenfekvő probléma a felbontáson túl az, hogy a vizsgált mintaterület magasabban illetve mélyebben levő (fókuszon kívül eső) részeiről érkező információ csökkenti az előállított kép kontrasztosságát. Ez a jelenség főként vastag mintákra érvényes.

Konfokális Lézer Pásztázó Mikroszkóp

A vastagabb biológiai preparátumok, szövetek, sejtek vizsgálatában a Konfokális Lézer Pásztázó Mikroszkóp (CLSM) tudta megoldani azt a problémát, hogy a különböző

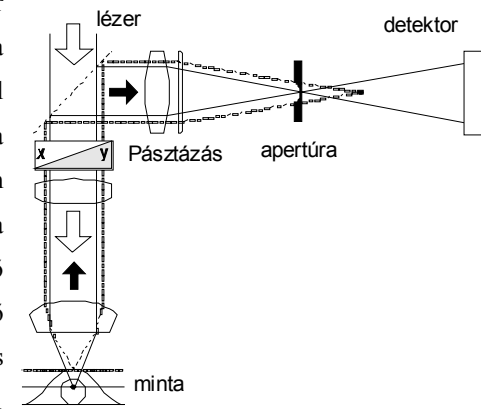
egymáshoz közel lévő rétegek egyszerre történő, összefolyó leképezése helyett, optikailag élesen elválasztható vékony rétegekből kapott képeket vegyen fel, azokat komputerben tárolja, és a vékony rétegekből a képeket tetszőlegesen összerakja.

A 5. ábra mutatja a pásztázás nyújtotta előnyöket. A kép egyes pontjai szűk apertúrán keresztül, raszterpontoszerűen képződnek le. Ezzel a hagyományos mikroszkópos képhez képest keskeny, jól definiált rétegből nyert éles képeket lehet kapni. A komputeres tárolási és újra előhívási lehetőség azzal jár, hogy pl. adott sejt belsejébe "betekinthetünk", anélkül, hogy azt elmeteszénénk.

A lézersugár közvetlenül a mintára fókuszált, egy pásztázó rendszer és egy nagy numerikus aperturájú lencse segítségével. A pásztázó lézersugár által gerjesztett fluoreszcens fény a tér

szóródik. Ennek a az objektív lencse által így visszajut a rendszerbe majd onnan tükör segítségével jut a lencse fókuszában levő nyaláb a gerjesztő úton ellentétes nyalábosztó irányába. A detektor közé lyuk csak ezt a

minden irányába fénynek egy része összegyűjtődik és pásztázó egy féligáteresztő detektorra. A helyről érkező fényvel azonos irányban halad a A nyalábosztó és apró nyalábot engedi



5. ábra

át a detektor felé. A fókuszon kívül eső fluoreszcens fény (szaggatott vonal) nem jut el a detektorig ebben a rendszerben, növelve ezzel a kontrasztot. Ez esetben a sugarak fókuszpontja valahol az apertúra mögött van, ld. 5. ábra. A kétdimenziós képi ábrázoláshoz a lézer egy adott területet pásztáz végig és az indukált fluoreszcens fény detektálódik és konvertálódik videó jellé, ami a képernyőn megjelenik. A lézer jelentősége abból fakad, hogy a keskeny apertúrán (gyakorlatilag μm nagyságrendű átmérőjű lyuk; pinhole) áthaladó fénysugár intenzitása igen legyengül. A lézerefény intenzitása azonban még ekkor is elegendő ahhoz, hogy elektronikusan értékelhető jelet kapjunk. A kép nyilván annál élesebb, minél kisebb a fénypont szétterülése. A modern

nagyteljesítményű asztali számítógépek ugyancsak hozzájárultak ahhoz, hogy a Davidovitz és munkatársai által 1969-ben megkonstruált CLSM elterjedjen és valóban igen jól használható készülékké váljon. A kiinduló pont Nomarski (1955) differenciális fáziskontraszt optikai mikroszkópja volt, ami a Zernike féle hagyományos fáziskontraszt mikroszkópot jelentősen felülmúlta abban, hogy az optikai "késleltetés" mértékét regisztrálta pontonként.

Az igazi differencia a CLSM javára az, hogy a reflektált, vagy áthaladó fénysugarakat optikai lencse fókuszálja a kimenő apertúrára, mielőtt egy fotodetektor érzékeli. Ezzel a fókusznak a mélysége nagymértékben csökken, ami a konfokalitásnak a feltétele. Így csak azonos keskeny rétegből származó sugarak jutnak az egy pásztázási mező által kialakított képre. Tehát az elv egyszerű és lényegében a készülék alig valamivel bonyolultabb, mint a hagyományos optikai mikroszkóp, mégis forradalmasította az új biológiai ismeretek szerzésének lehetőségeit.