

## Fluoreszcens mikroszkópia

A fluoreszcens mikroszkóp használatakor a vizsgált objektumot meghatározottan szeparált, általában UV fényel világítjuk meg. A megvilágító fénycsőhossz létrehozásához nagy erejű Xe-, Hg- gőz lámpát használunk fényforrásként. Az így létrehozott látható fényből a gerjesztő fényspektrumot (UV) az excitációs szűrővel szűrjük ki a látható fény spektrumából.

A gerjesztő fény hatására a jelölőanyag, vagy minta -autofluoreszcens pl.: spórák-; fény formájában energiát sugároz vissza: ez az emisszió jelensége.

A fluoreszcensen jelölt vagy autofluoreszcens mintáról visszasugárzott (emittált) fényből az emissziós szűrővel választjuk el a képképzésben nem használt fényt.

*Fluoreszcens jelölőanyagok (festékek):*

- Klasszikus festékek:
  - Dapi (4',6'-diamidino-2-phenylindole):
    - A DNS nagy árkába, a A-T gazdag régiókba kötődik, az emissziós intenzitása a bekötődéskor a legnagyobb.
      - A Dapi festék képes átjutni az intakt membránon, így élő sejtek festésére is alkalmas.
    - Excitációs maximuma: 358 nm UV spektrumban gerjesztve
    - Az emissziós spektruma széles, maximuma: 461 nm.
    - Ha RNS-hez kötődik, akkor az emissziós maximum 500 nm-re tolódik.
  - Holchest-festékcsalád: Hoechst 33258, Hoechst 33342, és Hoechst 34580
- Interkalálódó (a visszasugárzott fluoreszcencia mennyisége arányos a jelölt egység mennyiségével) festék:
  - PI (propidium iodide):
    - DNS-hez és RNS-hez is kötődik, nincs specifikusan preferált kötődési helye, interkalálódó festék.
    - Csak az elpusztult sejtekbe képes bejutni.
    - Erősen rákkeltő
    - Excitációs maximuma 538 nm.

– Emissziós maximum 619 nm

- Cyanide festékek:
  - SYTO (membránpermeabilis)
  - SYTOX (impermeabilis)
- UV alternatív festékek
  - DRAQ5 (membránpermeabilis)
  - DRAQ7 (impermeabilis)

### **Kromatin kondenzálódási intermedierek vizsgálata:**

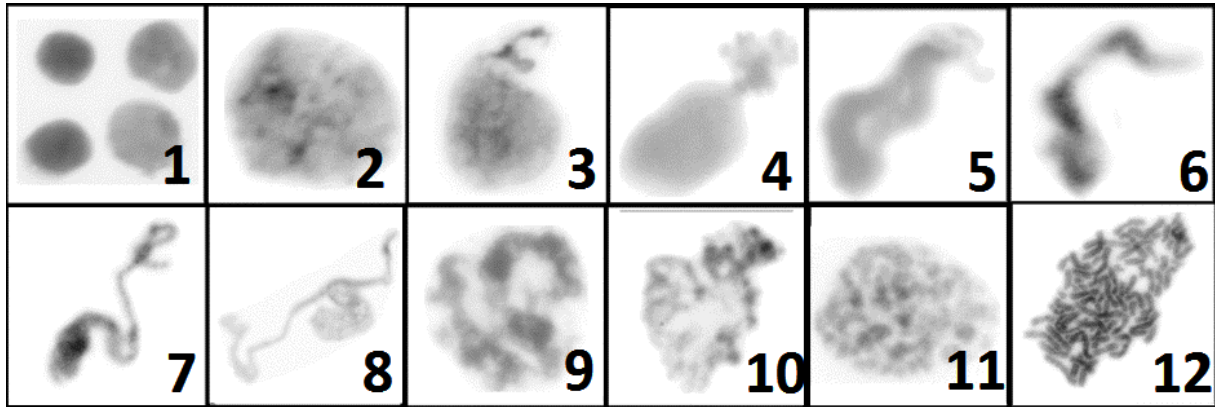
A sejtmag anyaga a maghártyán belül megjelenését tekintve heterogén: a lazábban szerkezetű dekondezálta forma: az eukromatin –jellemző rá hogy a DNS szálak nem kötődnek erősen a hiszton fehérjékhez, és ezeken a szakaszokon történik a DNS-RNS átíródás aktív génkifejeződés,- és a kondenz megjelenést mutató erősen festődő heterokromatin- jellemzője hogy itt a DNS erősen kötődik a hiszton fehérjékhez aktív átíródás nincs. Két fajtája van: fakultatív, visszatérhet heterokromatikus formába, átíródhat, és a konstitutív, ami sosem íródik át.

#### *Kromoszómák kialakulása:*

A sejtmagban a kb. 2 m hosszú DNS szál a hiszton fehérjékhez kötődve fordulnak elő. A sejtosztódás folyamata alatt jönnek létre a fehérjékhez kötött DNS:- kromatin - szálakból a kromoszómák a kondenzálódási intermediereken keresztül.

A kondenzálódási folyamat első fázisában a sejtmag anyaga homogén fátyolos vagy felhőszerű megjelenésű. A kondenzálódás kezdeteként a felhő több pontján tömörödés – kondenzálódási góccok jelennek meg. Ezzel egy időben a maganyag megtekeredése a mag polarizációja is zajlik. A magállomány, vagyis a kromatin állomány a kondenzálódás során kezdetben szalagos- a kromatin szálak egymáshoz tapadása révén, ilyenkor még laza kevésbé kondenz a maganyag,- majd a szupertekercselődés során fonalas szerkezet jön létre, esetlegesen előfordulhat a részlegesen csoportokra szétváló kromatin állomány a maganyag tekeredése miatt.

A fonalas szerkezetek további egymásra, önmagára tekeredése révén jönnek létre a kromoszóma előtelepek majd a kondenzálódás tovább haladtával a praekromoszómák, elongált kromoszómák (hosszúak alak még nem szeparált kromoszómák), és a folyamat befejeződésékképp a metafázisos kromoszómák.



***Gyakorlat leírása a jegyzőkönyv kötelező részei:***

Ismerkedés a fluoreszcens mikroszkóppal, olaj-immersiós objektívek használata.

Sejtmagpreparátum vizsgálata Dapi festéssel, a kromatin formák felismerése, jellemzése.

Saját sejtmagpreparátum (szájnyálkahártyáról) készítése fluoreszcens mikroszkópiához. A kenet epithel sejtjeinek jellemzése, sejtmagok kromatin formáinak besorolása.

**Referenciák:**

[www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html](http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html)

[www.cbit.uchc.edu/microscopy\\_facility/fluorescent\\_probes.html](http://www.cbit.uchc.edu/microscopy_facility/fluorescent_probes.html)