

# BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA

## 2. rész

**Előadó:**        **Ballagi András, Ipari Professzor**  
**Richter Gedeon NyRt. - BME**

**Írásos segédanyag található a:**

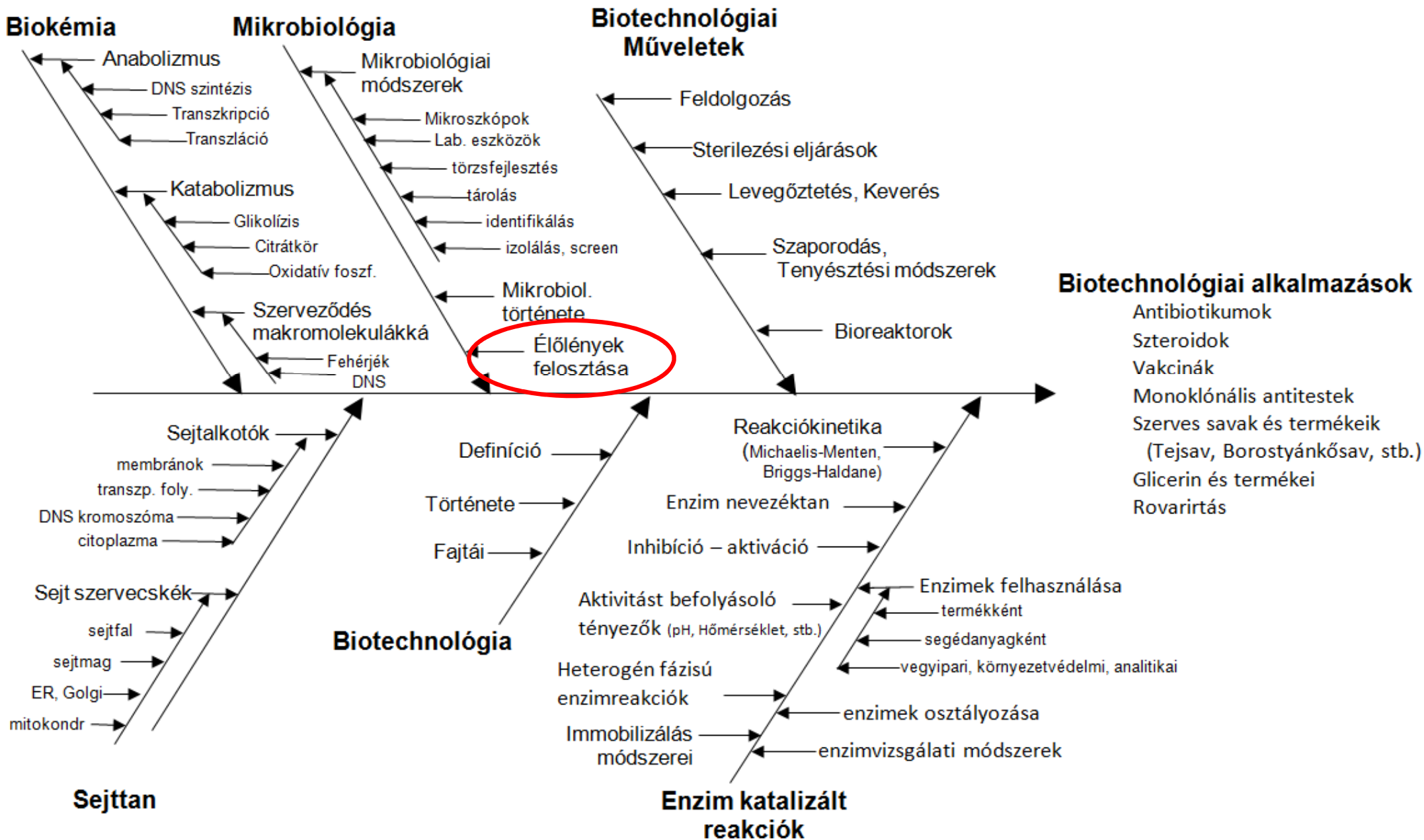
<http://oktatas.ch.bme.hu>

[/oktatas](#) [/konyvek](#) [/mezgaz](#)

[/Biol-biotech-vegyész-MSc](#)    **címen**



# Itt járunk:



# Miért tanulmányozzuk a mikroorganizmusokat

**Az élet minden területén előfordulnak**

- Minden környezetben előfordulnak (űrmikrobiológia is!)
- Az élet fenntartásához szükséges folyamatokban (élelmiszeripar, tápláléklánc és körforgás)
- Előnyös jelenlét sok biotópban (humán bélflóra, bőrfelület)
- Kis részük patogén
- Sok gazdasági probléma okozói is



EXPOSE-E facility mounted on the EuTeF platform of the European Columbus module of the ISS.  
(Courtesy of ESA and NASA.)

Survival of microorganisms in space protected by meteorite material: results of the experiment 'EXO [Adv Space Res. 2002]

Long-term survival of bacterial spores in space.

[Adv Space Res. 1994]

Overview of the space environmental effects observed on the retrieved Long Duration Exposure Facility [Adv Space Res. 1994]

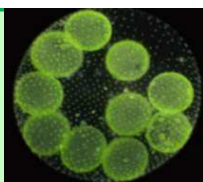


## Eukarióták

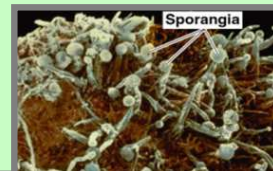
Cellulóz sejtfa

Fotoszintetizálók

Molekuláris oxigén és  
szerves anyag  
termelők



# Élőlények felosztása



## Eukarióták

Kitin sejtfa

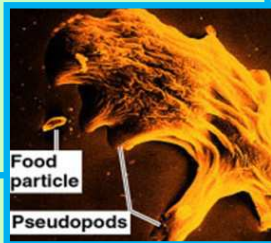
Szerves  
vegyületek  
fogyasztása

Fonals,  
többsejtű,  
egysejtű lehet

## Eukarióták

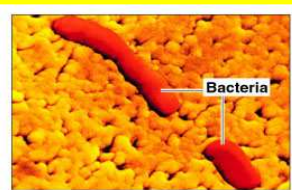
Szerves vegyületek  
fogyasztása

Állábakkal v. ostorral  
mozog,  
Néhányuk  
parazita



## Prokarióták

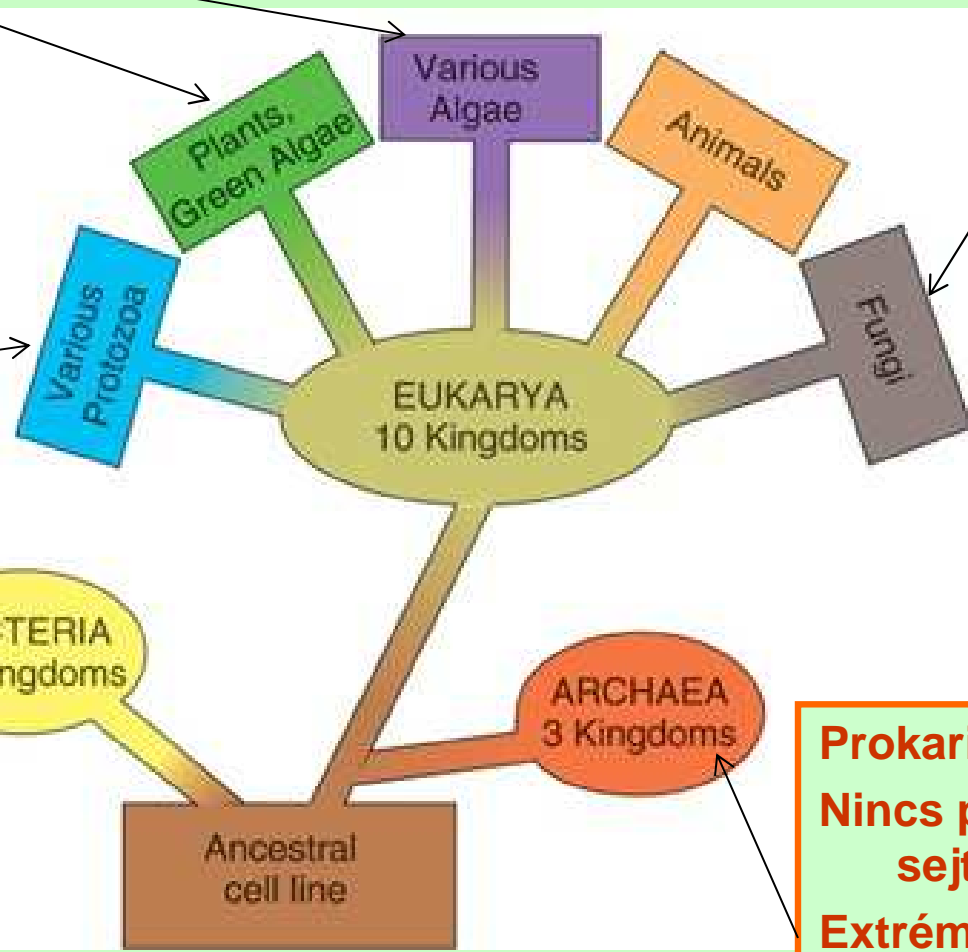
Peptidoglikán sejtfa  
Hasadásos osztódás  
Energiatermelés:  
Szerves, szervesetlen  
vegyületek  
Fotoszintézis



BACTERIA  
12 Kingdoms

ARCHAEA  
3 Kingdoms

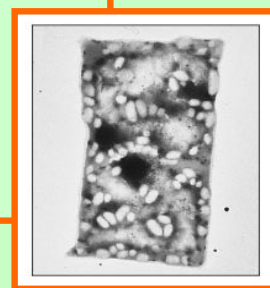
Ancestral  
cell line



## Prokarióták

Nincs peptidoglikán  
sejtfa

Extrém körülmények:  
Metanogének,  
extrém só tőrők,  
extrém termofilek



# Nevezéktan

**Carolus Linnaeus (1735) (Karl Linné)**

**Binomialis (tudományos) elnevezés**

**Minden fajnak két neve van:**

**Nemzettség (Genus) – főnév, mindig nagy betű**

**Faj (species) – melléknév, kisbetű**

**Szövegben mindkét név dőlt betű, vagy aláhúzott**

***Staphylococcus aureus* (S. aureus)**

***Bacillus subtilis* (B. subtilis)**

***Escherichia coli* (E. coli)**

**Ha két szervezet azonos nemzettség nevet visel, akkor genetikai rokonságban vannak.**



# Mikroökológia

Élőhelyek: levegő, víz, talaj

Életformák: kommenzalista,

mutualista (szimbiózis), parazita

Életkörülmények: hőmérséklet tolerancia

(pszichrofil, mezofil, termofil)

pH tolerancia (acidophil, neutrophil, alkalophil)

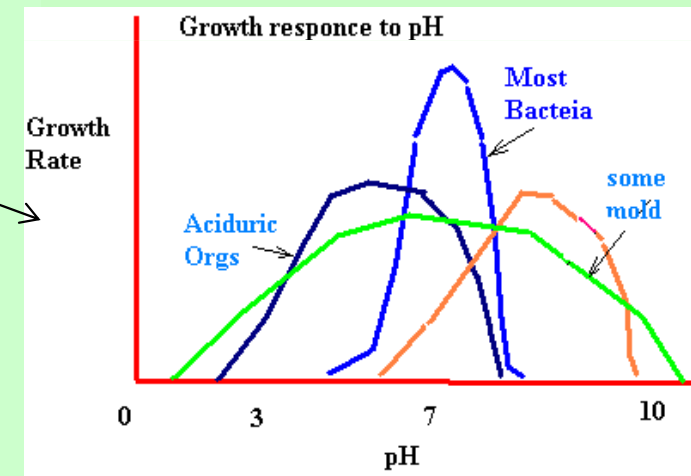
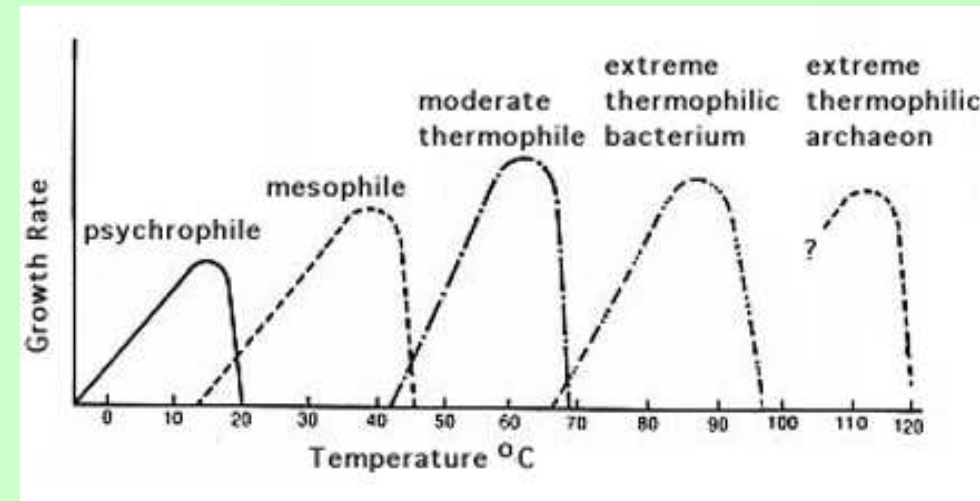
só tűrés (ozmotolerancia)

Mikrobák szerepe a bioszférában: fotoszintetizálók

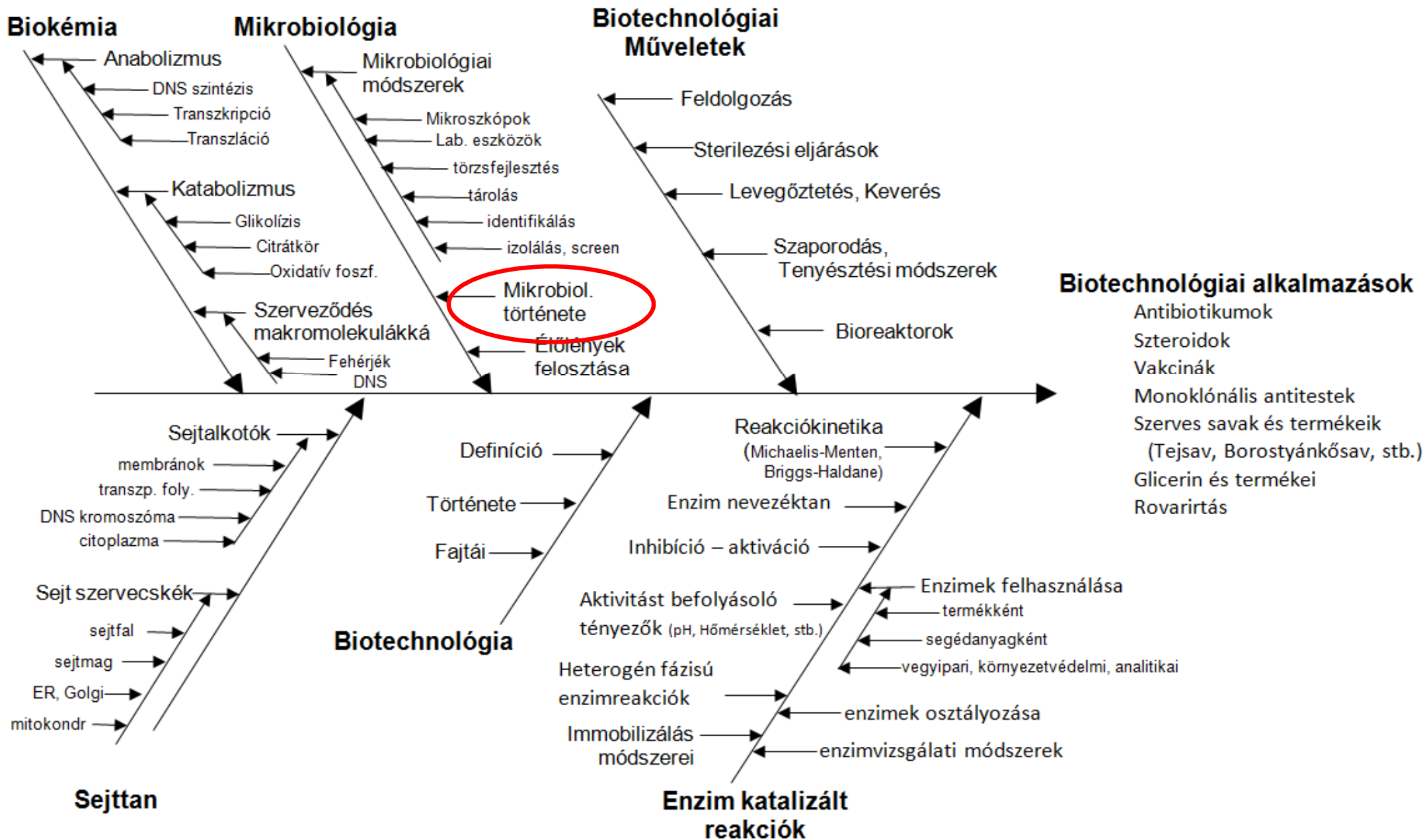
(CO<sub>2</sub>-t megköthetnek),

Energiát termelhetnek

lebontók: C, N, P, S körforgalomba visszajuttatása



# Itt járunk:



# Keletkezhet-e spontán módon élet?

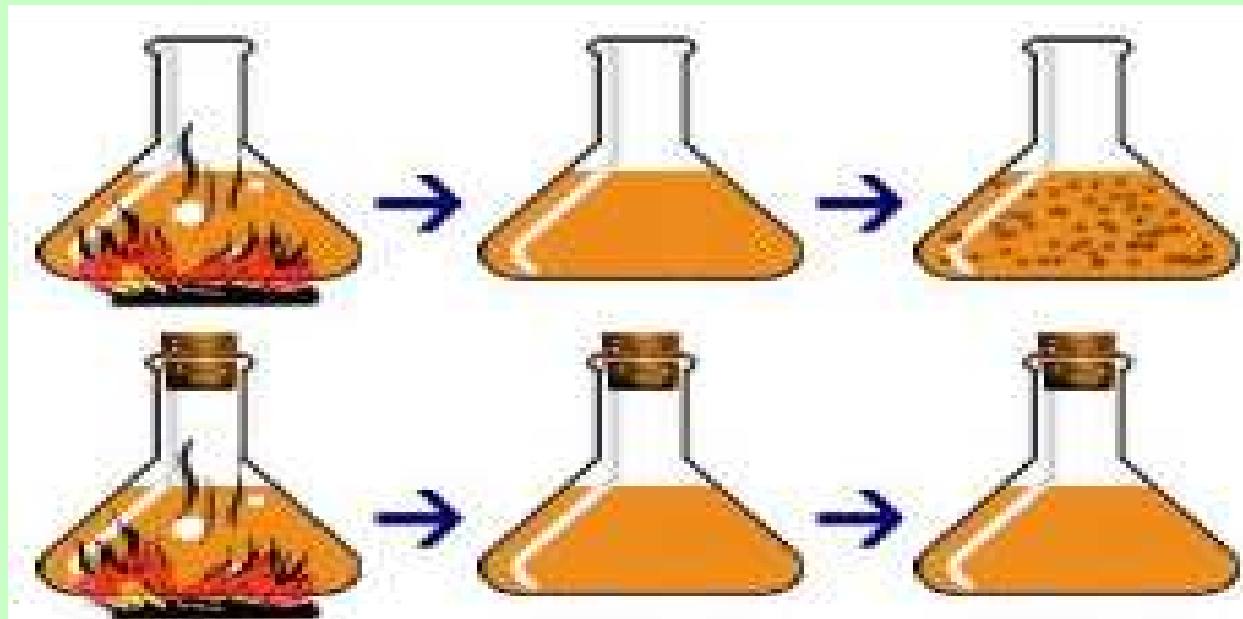
Mi okozza kis élőlények megjelenését romló táplevesben?

*Needham hipotézise: a mikrobák spontán keletkeznek*

*Spallazani' hipotézise: a mikrobák a levegőből jönnek*

**A forralás megöli őket**

Needham >



1713 - 1781

Spallazani >



1729 - 1799





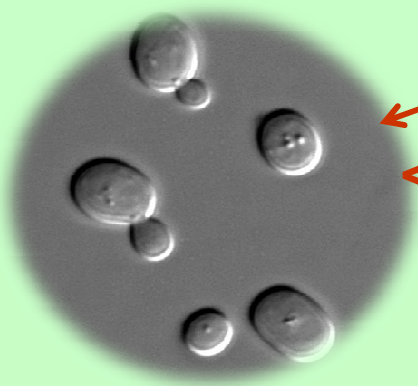
# A tudatos ipari mikrobiológia kezdete: Luis Pasteur



1822 - 1895

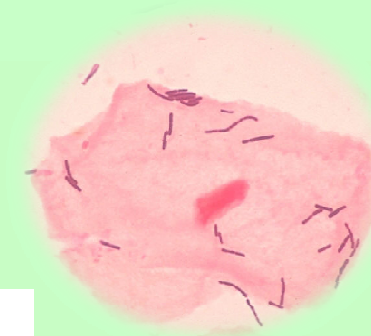
## Pasteur megfigyelése:

Ezek élettelen gömbök, vagy élő mikroorganizmusok?



< élesztő + szőlő = ízletes bor 😊 (ethanol)

bakterium + szőlő = rossz bor ☹️ (lactic acid) >



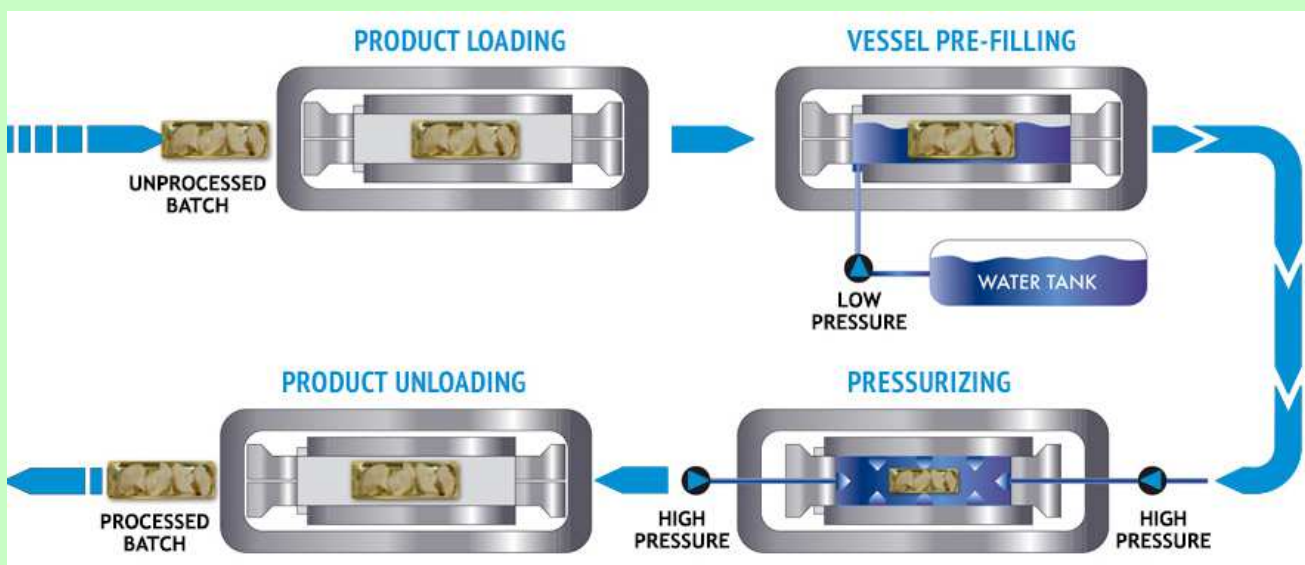
# Fermentáció és pasztörözés

Pasteur kimutatta, hogy a fermentációs folyamatokért a mikroorganizmusok felelősek. Pl. cukor fermentációja alkohollá a sör és bor készítésben.

A mikroba-szaporodás az élelmiszerromlásért is felelős: baktériumok, amelyek alkoholt használnak és ecetsavat termelnek a bort ecetté változtatják.

Pasteur kimutatta, hogy ezek a rothasztó baktériumok elpusztíthatók hővel, amely ugyanakkor nem tartós hőkezelés, így az alkohol nem távozik, az ital változatlan marad. Ez az eljárás a pasztörözés, amely más folyékony élelmiszereknél is hatásos.

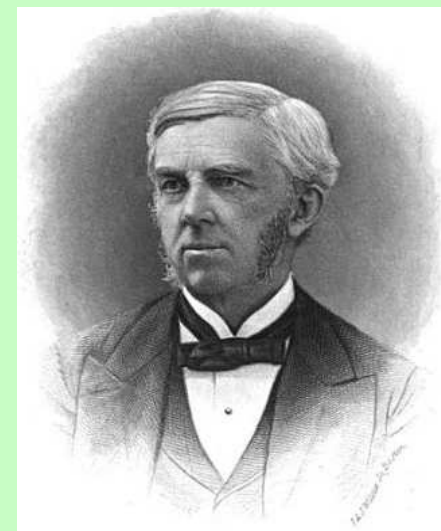
**Pasztörözés nyomással (High Pressure Process) 6000 bar, 3 perc**



# Elméletek a betegségek mikrobiális eredetéről

## Oliver Wendell Holmes (US)

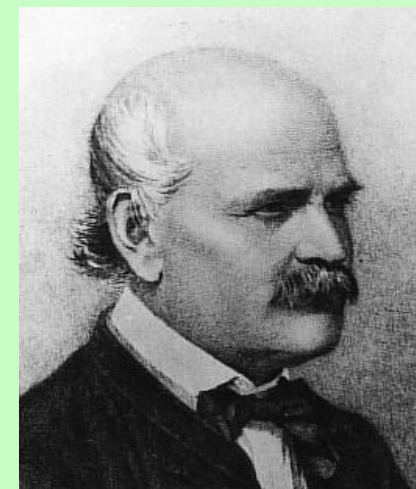
Meggyőződése volt, hogy a szülés utáni elhalálozás (gyermekágyi láz) gyakran ered az ápolónők és az orvosok kezéről.



1809 - 1894

## Semmelweis Ignác (Ausztria – Magyarország)

Észrevette, hogy a halálozási arány magasabb, ha orvostanhallgatók végzik az ápolást, mint mikor az ápolónők. (Mert az orvostanhallgatók boncoltak is.)  
Nyáron a halálozási arány lecsökkent. (Nem voltak boncolási gyakorlatok.)



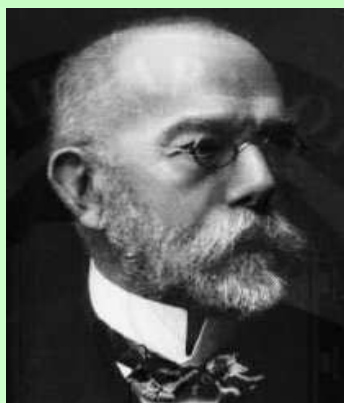
1818 - 1865



# Elméletek a betegségek mikrobiális eredetéről

**Robert Koch**

1843 - 1910

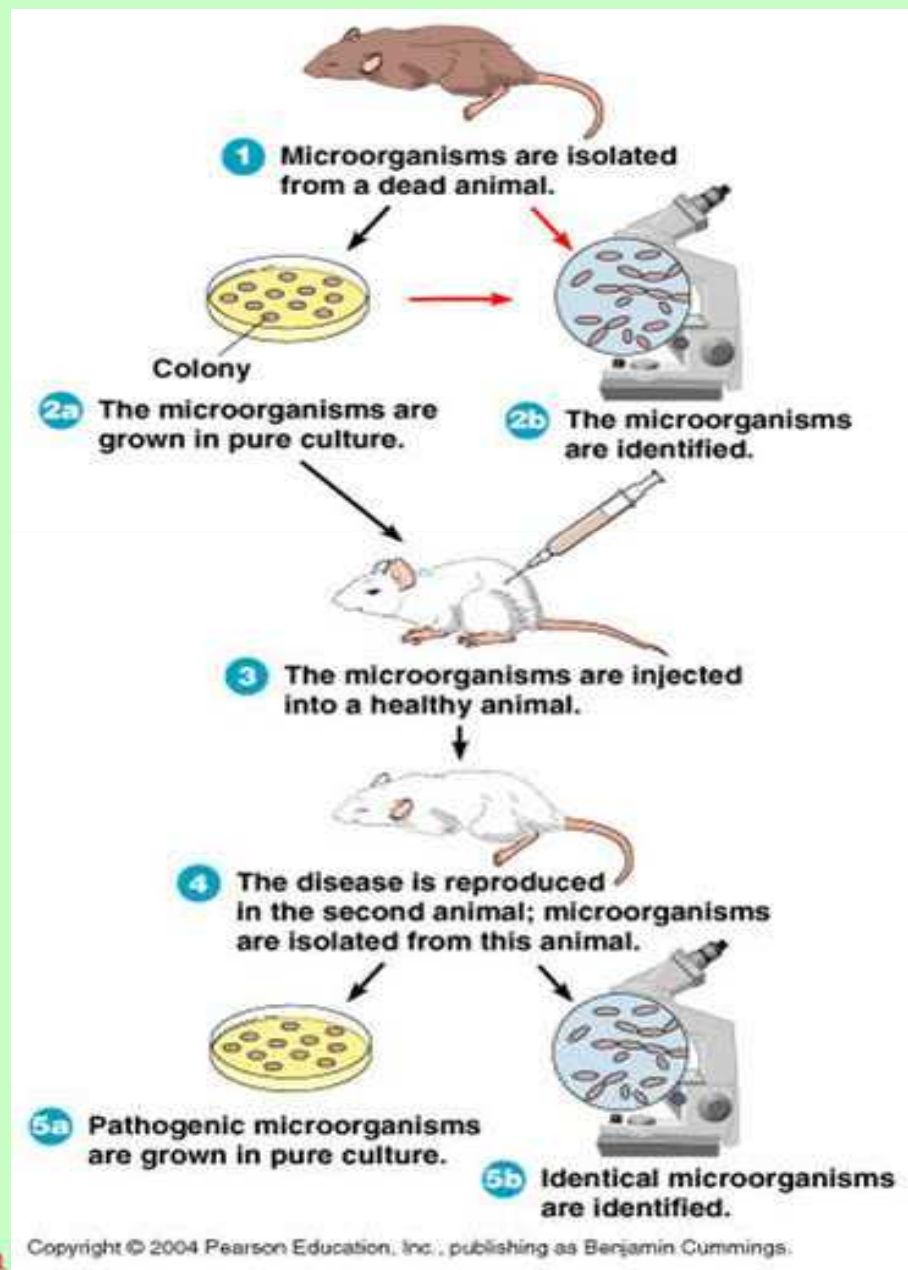


**Baktériumok tenyésztésére alkalmas tápközegeket kutatott. A zselatin elfolyósodott. Egy kollega felesége ajánlotta a konyhában használatos agart. (Tengeri moszatból származó poliszacharid). Nem olvad és nem folyósodik. Hiszterézis az olvadáspontban! Egyéb tápkomponensek keverhetők hozzá.**

**Koch bevezette a kétrészes Petri csésze használatát (elnevezés Julius Petri, német bakteriológusról) és a tiszta baktériumtenyészetet biztosító technikát.**



## Koch féle fertőzés posztulátum



# Az immunológia kezdetei: Edward Jenner

Tudatában volt annak a népi igazságnak, hogy aki szarvasmarha himlőt kapott korábban nem kap himlőt később.

A szarvasmarha himlő enyhe rosszullétet, fájdalmat, néhány pattanást és nyelési nehézséget okoz. Néhány nap alatt elmúlik.

Ezzel szemben a himlő erőteljes torzulást, néha vakságot, gyakran halált okoz.

Jenner, az 1700-as évek végén kis bemetszést, vagy beszúrást végzett szarvasmarha himlő anyaggal emberek karján, hogy elkerülje a himlő fertőzést.

Jenner munkája több életet mentett meg, mint bármely más emberi erőfeszítés.



1749 - 1823



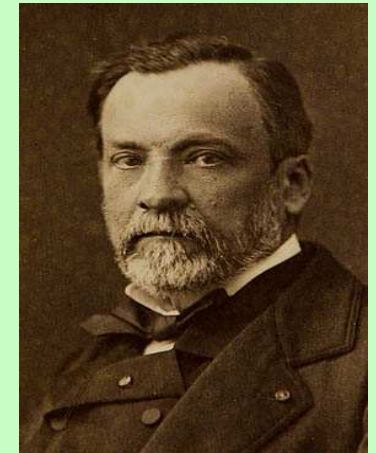
# Az immunológia kezdetei: Luis Pasteur

Pasteur a szárnyas kolera elleni megoldást keresett csirkékben.

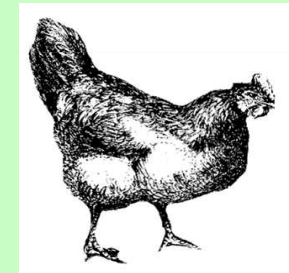
Egyik munkatársa elhalasztotta az oltást egy csoport csirkében, és figyelemre méltó eredmény született: Az oltás ezzel a lejárt tenyésztettel ellenállóvá tette a csirkéket a szárnyas kolera ellen.

A mikroorganizmusok legyengültek vagy kihígultak

Pasteur hasonló módon átalakított más organizmusokat is, (lépfene, veszettség), mellyel kidolgozta az oltás és immunizálás módszerét.



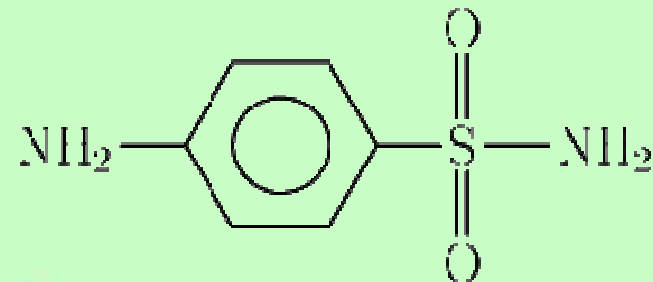
1822 - 1895



# A modern kemoterápia megjelenése

- Vegyületekkel való kezelés a kemoterápia.
- A fertőző betegségeket kezelő vegyületek természetes anyagok (pl. kinin fa kéregből malária ellen), szintetikus gyógyszerek, vagy antibiotikumok.
- Az antibiotikumok olyan vegyületek, amelyeket baktériumok, vagy gombák állítanak elő, hogy gátoljanak, vagy megöljenek más mikroorganizmusokat.
- 1910: Paul Ehrlich kifejlesztett egy arzén tartalmú vegyületet a Salvarsant a szifilisz kezelésére.

- 1930-as évek: szulfonamidok szintézise



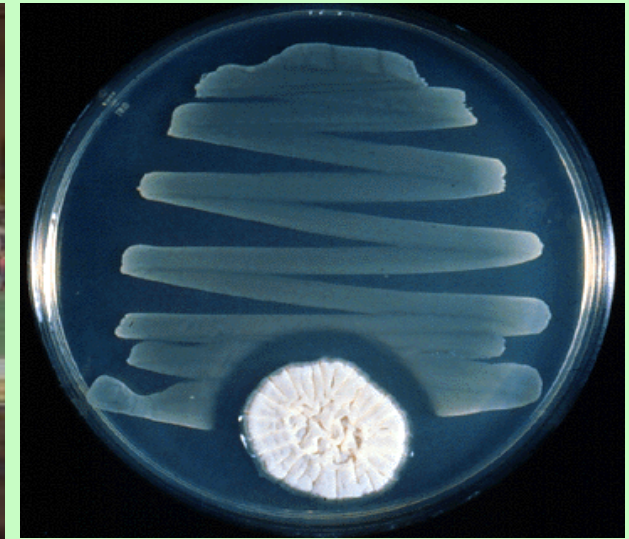
# Az antibiotikumok megjelenése


Alexander Fleming (1881 – 1955), Skót biológus és gyógyszerész észrevette, hogy a sztafilokokkusz baktérium kolóniái eltűntek a penész által fertőzött tenyészetben.

Fleming kiextrahálta a hatóanyagot a gombából, amely a baktérium telep eltüntetéséért volt felelős.

Ez vezetett ahhoz a felfedezéshez, hogy bizonyos gombafajok a baktériumok szaporodását gátló anyagokat termelnek.

A terméket penicillinnek nevezte el, mert a gomba a *Penicillium chrysogenum* volt.



Penicillin Structure	R Group	Drug Name
	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	penicillin G
	$\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_6\text{H}_5$	penicillin V
	$-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_5$	ampicillin
	$-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$	amoxicillin
	$\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{CH}_3)-\text{CH}_3\text{O}$	methicillin

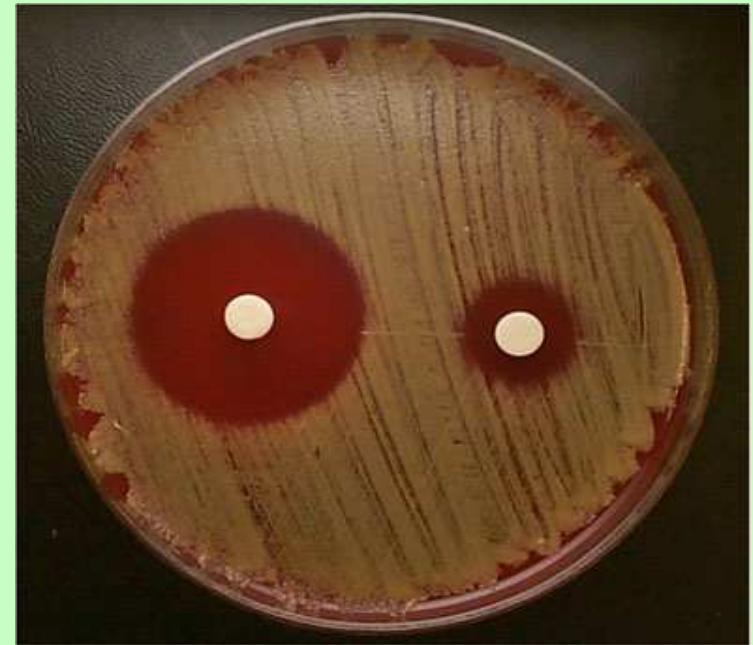




# A penicillin gátló hatása

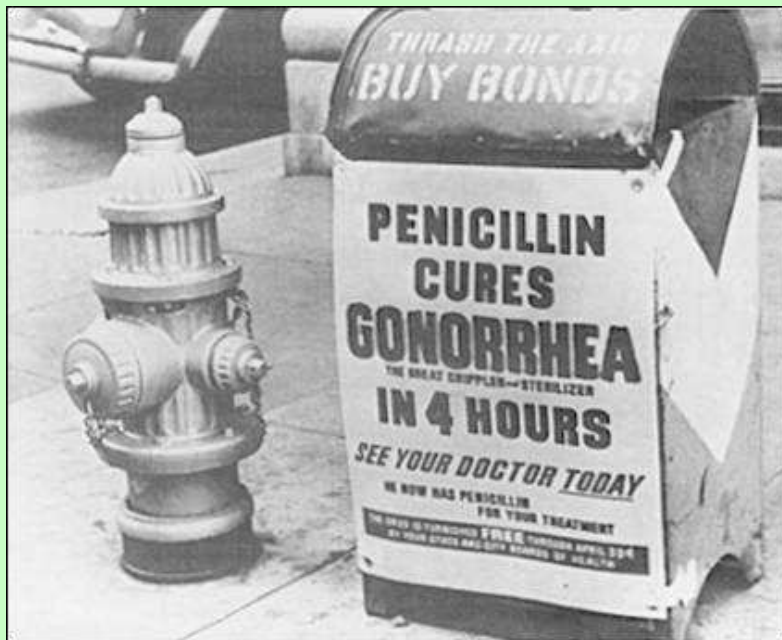
Az antibiotikumok hatásosságát mai napig úgy határozzák meg, hogy lemérik annak a gyűrűnek az átmérőjét, amelyben gátolta a baktérium növekedését.

Később – feltételezve, hogy találhatnak más gombákat, amik még több penicillin kibocsátására képesek, Szűrővizsgálatokat alkalmazva választották ki azt a *Penicillium chrysogenum* (NRRL1951) törzset, amelyet egy rothadt sárgadinnyéről izoláltak, és ez a törzs lett a szülő-egyede mindazon ipari mutáns törzseknek, amelyekkel jelenleg a világ igen sok országában a penicillint előállítják.

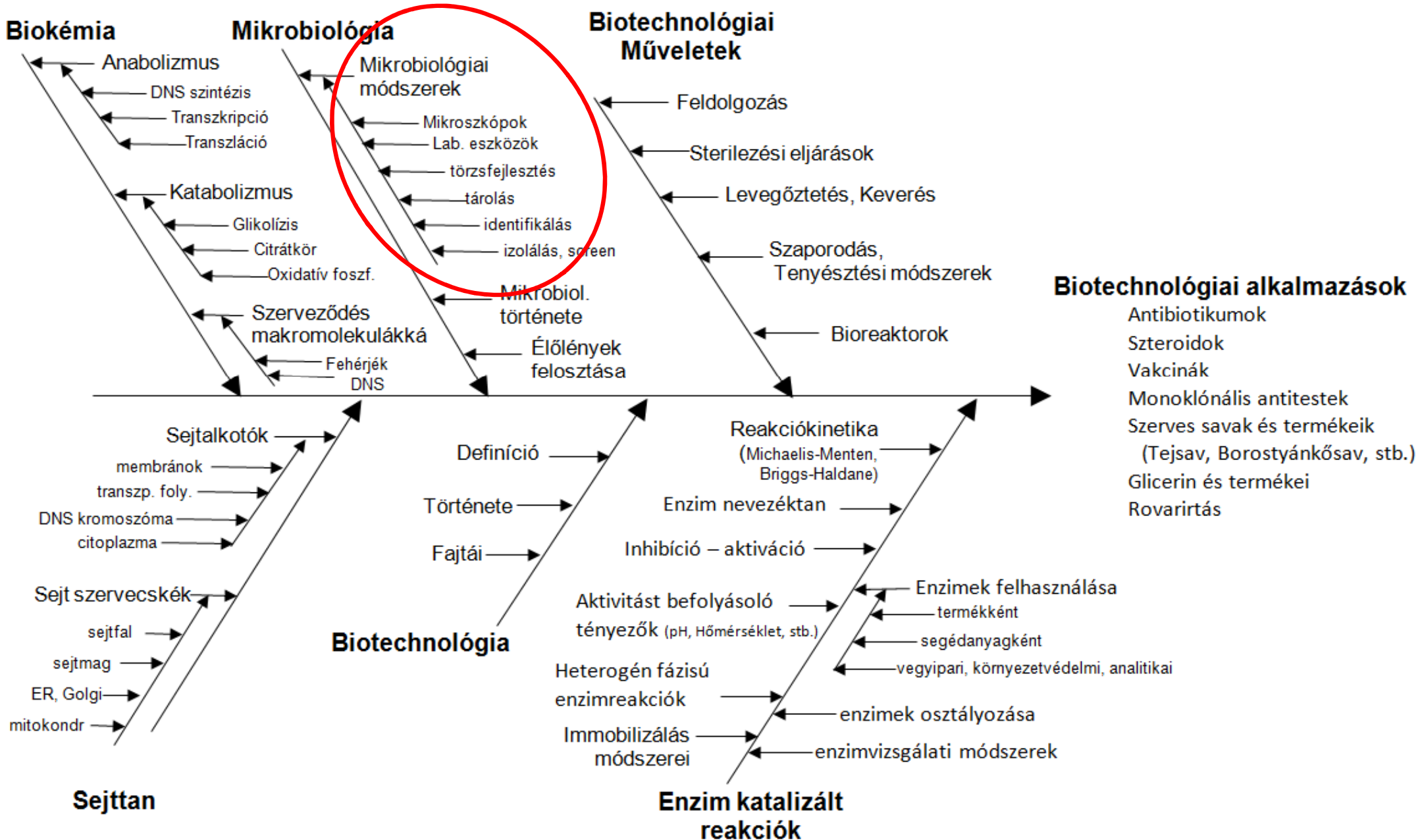


Fleming tudatában volt felfedezésének világméretű jelentőségével, ezért eljárását és a penicillint nem engedte szabadalmaztatni, hanem a gyógyítás érdekében az 1950-es évektől kezdve a világ minden országának rendelkezésére bocsátotta.

Orvosi Nobel díjat kapott 1945-ben.



# Itt járunk:



# Mikrobiológiai módszerek

## Izolálás

A technológia alapját képező mikroorganizmus megtalálása.

Beszerzési források: a mikroorganizmusok természetben lévő biotópjából – talaj, iszap, víz, levegő, élő szervezetek

Új anyagcsere termékek várhatók extrém körülmények között élő mikrobáktól: mély tenger, nagy magasságok (sztratoszféra), hideg körülmények, sivatagok, gejzírek, olajmezők.



# Mikrobiológiai módszerek

## Kényelmes beszerzési források: a törzsgyűjtemények

- American Type Culture Collection (ATCC).** Rockville, Maryland, U.S.A.,  
**NRRL:** US Department of Agriculture, Northern Regional Research Center
- NCIMB:** National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd.  
**FERM:** Fermentation Research Institute, Tokyo, Japan,  
**CMI:** Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England,  
**ECACC:** European Collection of Cell Cultures  
**C.I.P.:** Colletion de Bactéries de l'Institut Pasteur
- OKI:** Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteménye  
**Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem: Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye**  
**TUB-MCC** TUB Microbial Culture Collection - BME



# Mikrobiológiai módszerek

## Izolálás

### Szilárd minta

→ ez a leggyakoribb, mert itt legnagyobb a diverzitás  
minta → közvetlenül Petri csészére  
minta → vizes szuszpenzió → Petri csészére  
minta felszínéről steril vattával

### Inkubálás

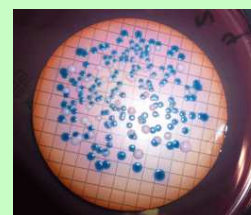
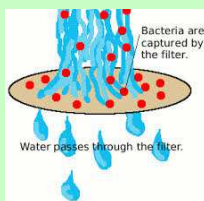


### Folyadék minta

→ esetleges hígítás → esetleges dúsítás előinkubációval



→ szűrés+agar+inkubálás



### Levegő minta

→ szűrés+agar+inkubálás



# Mikrobiológiai módszerek

Az agar egy komplex poliszacharid, amelyet vörös algából nyernek.

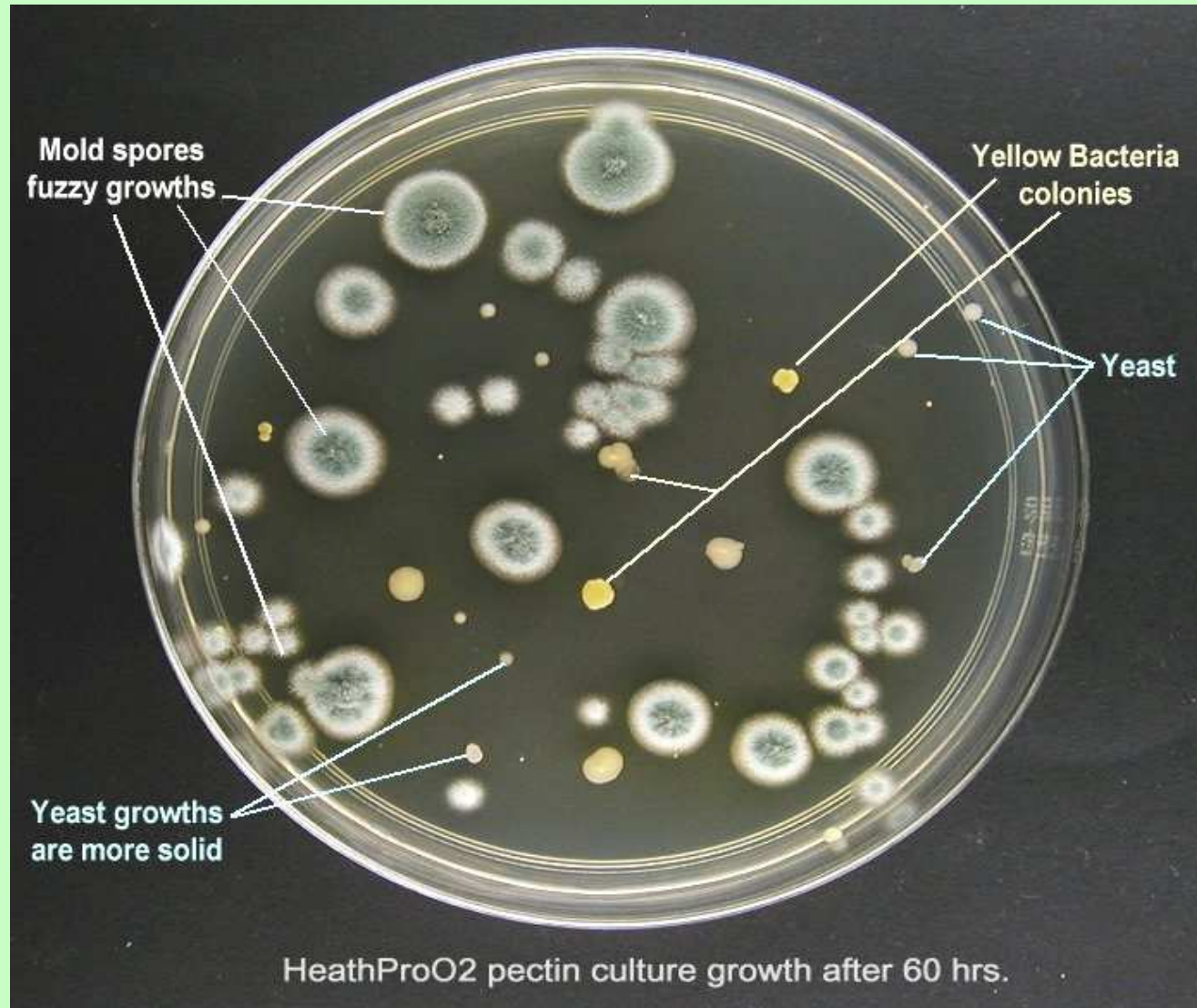
Szilárd szobahőmérsékleten, folyékony 100°C-on, de nem szilárdul meg hűtéskor csak 42°C-on.

Szilárd felületet biztosít tápanyagoknak és nedvességnek. A szaporodó mikrobák nem úsznak el, a kialakult telepek nem keverednek.



# Mikrobiológiai módszerek

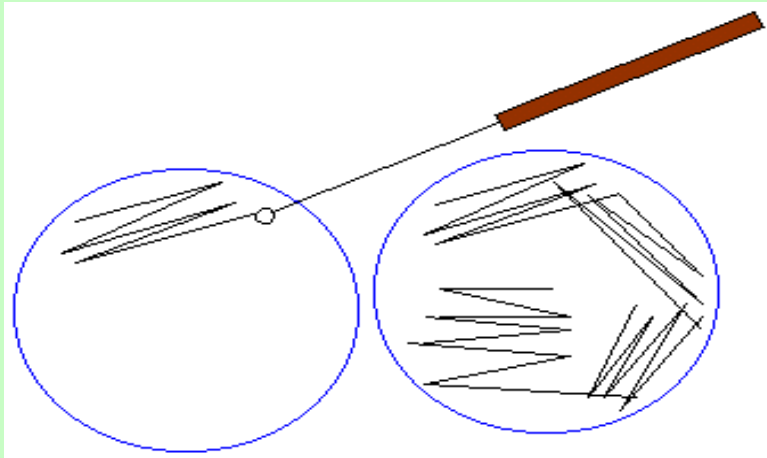
## Mikroorganizmusok egy természetes mintából





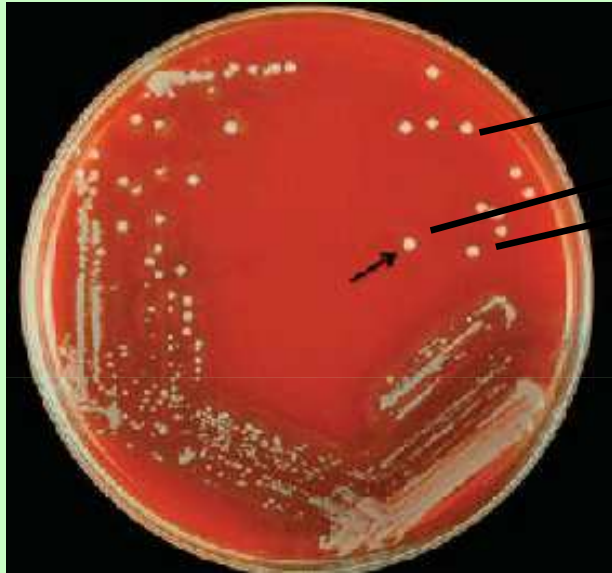
# Mikrobiológiai módszerek

## Egyetlen sejtől származó kolónia előállítása

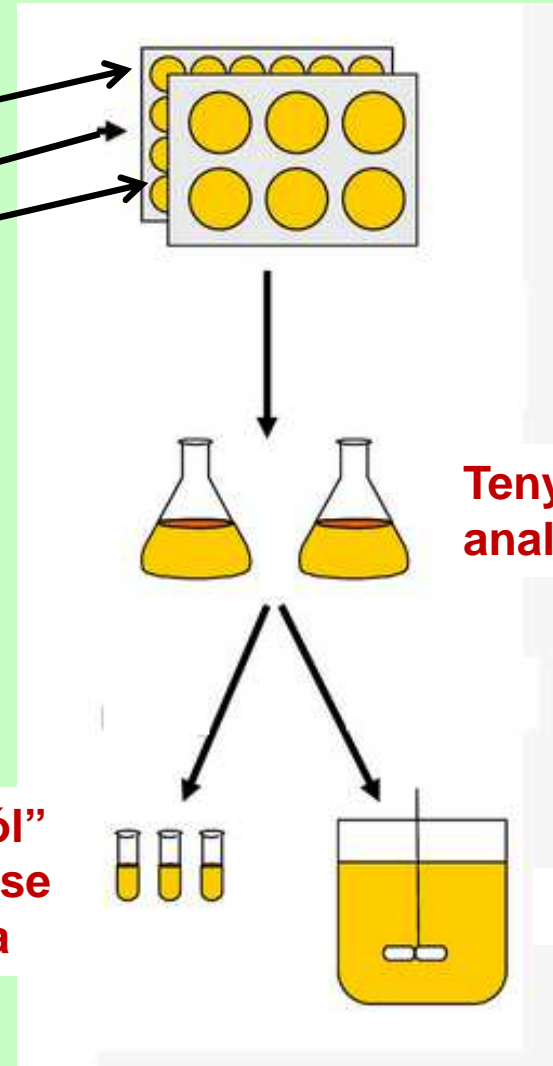


# Mikrobiológiai módszerek

## Izolálás és screenelés kézi módszerrel, sejtbank – Research Cell Bank (RCB) készítése



**A jó „találatokból”  
sejtbank készítése  
és lefagyasztása**



**Tenyésztés egyesével,  
analízis és kiértékelés**

**Technológiai tesztelés**

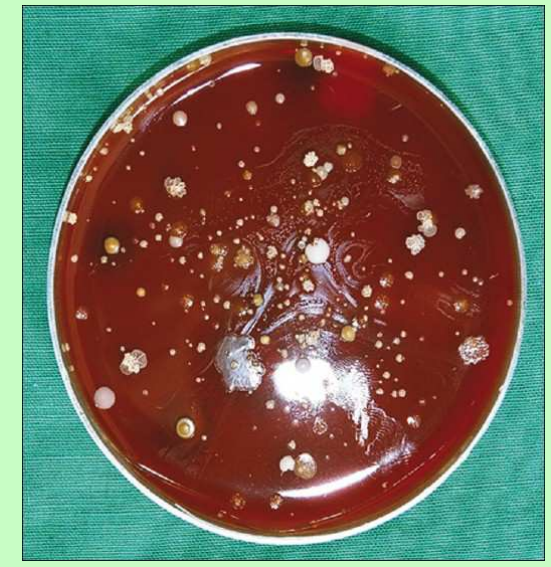


# Mikrobiológiai módszerek

## Dúsító tápközeg (enrichment media)

A dúsító tápközeg sok tápláló komponenst tartalmaz pl. vér, szérum, élesztőkivonat, hogy kényes és igényes mikroorganizmusokat is lehessen szaporítani.

## Véres agar és csokoládé agar (hőkezelt vér)



# Mikrobiológiai módszerek

## Szelektív média:

- pl.: antibiotikum → csak gombák nőnek
- antifungális szerek → baktériumok nőnek
- savanyú közeg → élesztők nőnek
- speciális tápanyag → pl. metanol hasznosítók nőnek
- aminósavak hiánya → heterotrófok nőnek

Inkubálás



## Eozin metilénkék agar

(Eosin-methyleneblue agar - EMB)

Metilénkék festéket tartalmaz,  
toxikus a Gram+ baktériumok számára,  
viszont a Gram– baktériumok szaporodni  
tudnak rajta.



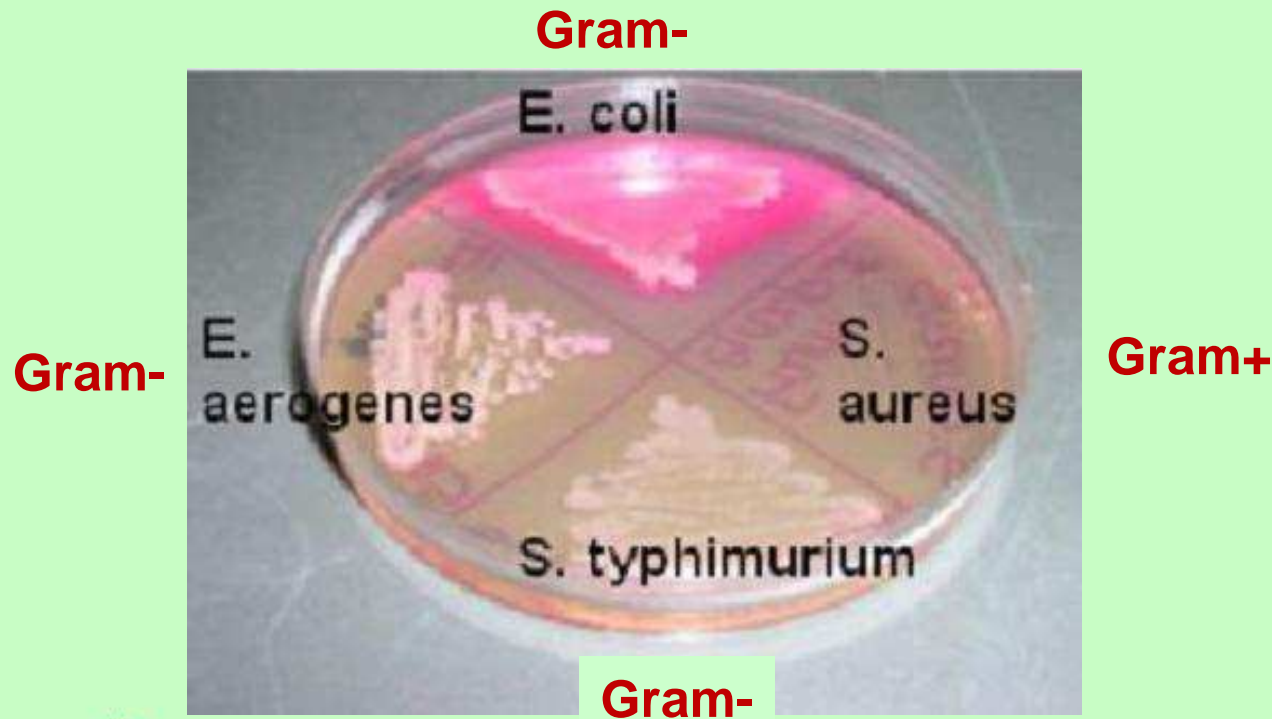
# Mikrobiológiai módszerek

## Differenciáló tápközeg:

A közeli rokonságban álló mikroorganizmusok, vagy csoportok közötti differenciálásra alkalmas.

Mindkét (vagy több) csoport képes szaporodni és telepet képezni, de különböző megjelenési formában (szín, telepek széle, vastagsága...)

Ezt a differenciálódást festékek és kémiai anyagok hozzáadásával lehet elérni. Pl., Mac Conkey (MCK) agar.



# Mikrobiológiai módszerek

## Screenelés (screening)

Keresni azokat a törzseket az izolátumok között, amelyek:

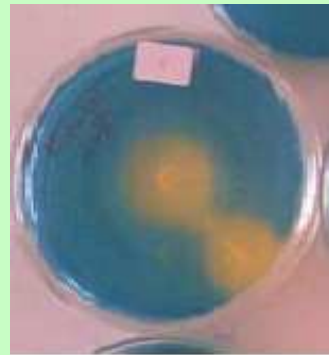
**Nagy termelőképeséggel rendelkeznek**

**Stabil biokémiai és genetikai tulajdonsággal rendelkeznek (80-100 gen.)**

**Nem termelnek káros melléktermékeket**

**Könnyen tenyészthetők nagy léptékben is (mert pl. elég gyorsan nőnek)**

**Egy példa: Tejsavtermelő baktérium törzs kiválasztása**



**Tápoldat  
+ pH függő  
festék  
+ agar**



**Tápoldat  
+ CaCO<sub>3</sub>  
+ agar**



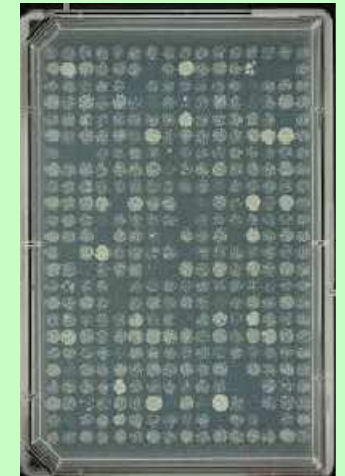
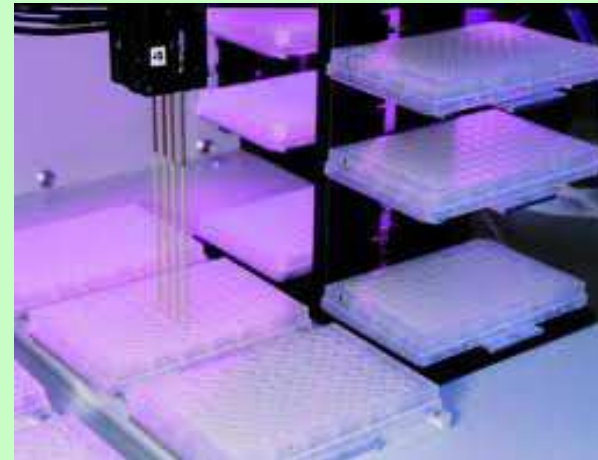
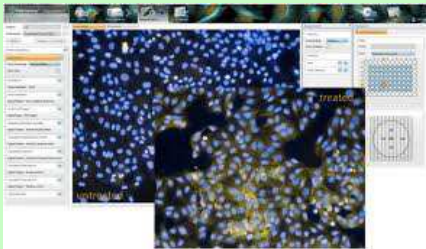
# Mikrobiológiai módszerek

## High Throughput Screening (HTS)

Nagy számban, automatizált módon keresni termelő törzseket az izolátumok között.

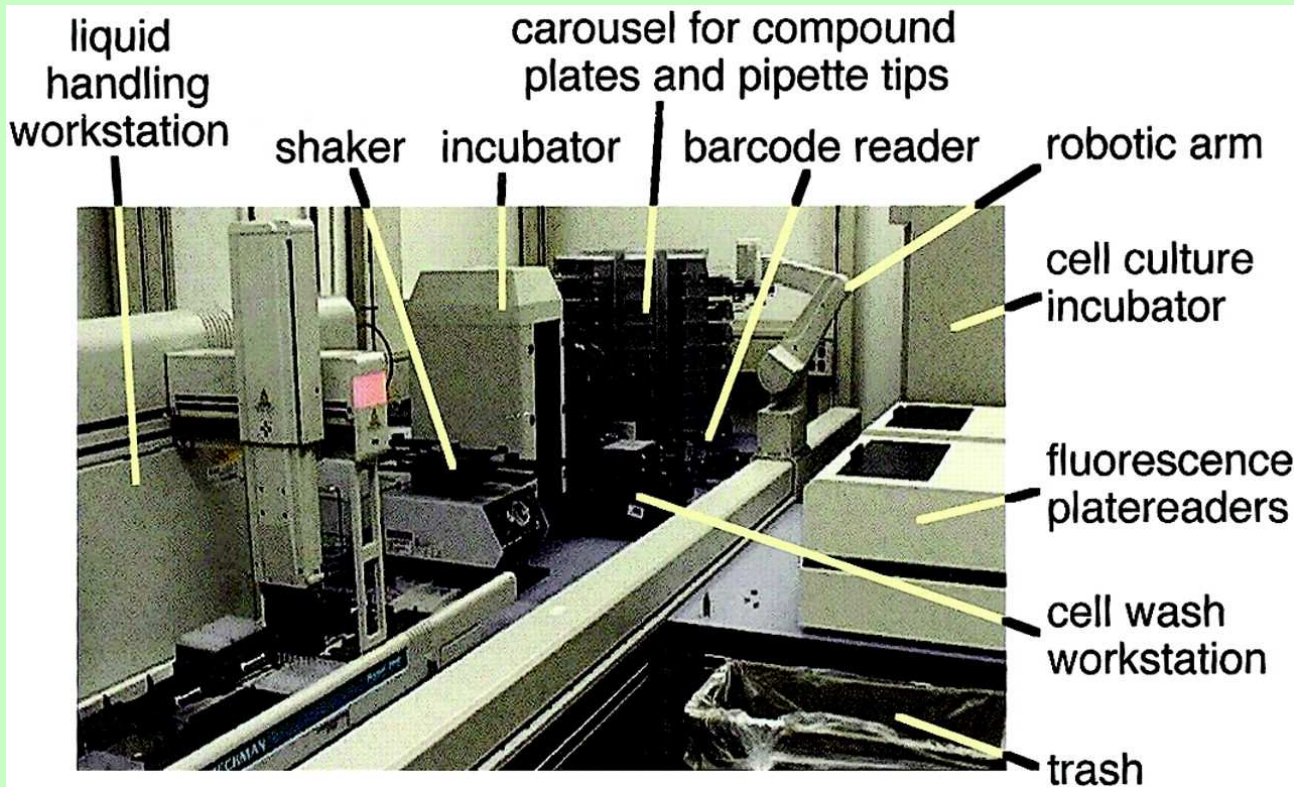
Lépései:

1. Egy sejtől indult kolónia azonosítása képelemzéssel
2. A kolónia érintése steril eszközzel (pipettahegy, pálca, kacs), v. mikrocshipsz alkalmazása mikroszkóp alatt.
3. A kolónia átvitele friss folyékony tápoldatba
4. Tenyésztés (inkubáció)
5. In-line v. at-line analízis sejtszámra, termékre, vagy intermedierre
6. A legjobb termelők elkülönítése további vizsgálatra



# Mikrobiológiai módszerek

## High Throughput Screening (HTS) work station





# Mikrobiológiai módszerek

## High Throughput Screening (HTS) multi work station



# Mikrobiológiai módszerek

## Azonosítás (Identification)

### Fenotípusosan:

makroszkópikus tul.: telep színe, nagysága, formája

mikroszkópikus tul.: sejt alakja, csoportosulása, mozgásszerve,  
sejtmagja, sejtfala (Gram festés, más festések)

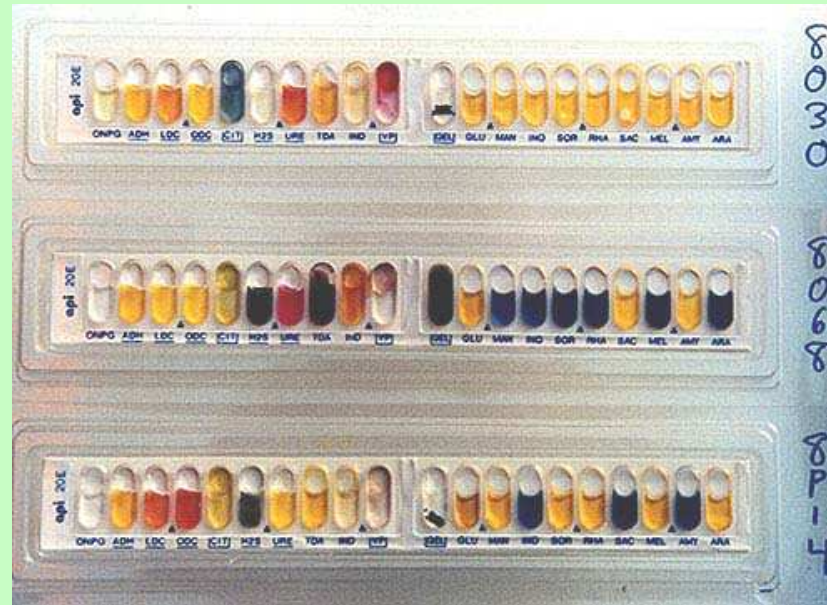
biokémiai tul.: oxidáz próba, aerob/anaerob dextróz fogyasztás,  
ureáz, kénhidrogén, Analytical Profile Index (API), stb.



# Mikrobiológiai módszerek

**Azonosítás:**

**Analytical Profile Index (API)**



**ONPG ( $\beta$ -galactosidase),  
ADH (arginine dihydrolase),  
LDC (lysine decarboxylase),  
ODC (ornithine decarboxylase),  
CIT (citrate utilization),  
H<sub>2</sub>S (sulfide production),  
URE (urease),  
TDA (tryptophane deaminase),  
IND (indole production),  
VP (Voges-Proskauer reaction),**

**GEL (gelatin liquefaction),  
GLU (glucose fermentation),  
MAN (mannitol fermentation),  
INO (inositol fermentation),  
SOR (sorbitol fermentation),  
RHA (rhamnose fermentation),  
SAC (sucrose fermentation),  
MEL (melibiose fermentation),  
AMY (amygdalin fermentation),  
ARA (arabinose fermentation)**



# Mikrobiológiai módszerek

## Azonosítás: Analytical Profile Index (API)

cultu re no.	O N P G	A D H	L D C	O D C	C I T	H 2 S	U R E	T D A	I N D	V P	G E L	G L U	M A N	I N O	S O R	R H A	S A C	M E L	A M Y	A R A
8030	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8068	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
8P14	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+

**8030** *Klebsiella pneumoniae*

**8068** *Proteus vulgaris*

**8P14** *Salmonella sp.*





# Mikrobiológiai módszerek

## Tartósítás, fenntartás

-aktív formában:

-szárítva ampullában (liofilezve)

-lelassítva agaron, hűtőben  
(időszakos átoltás)

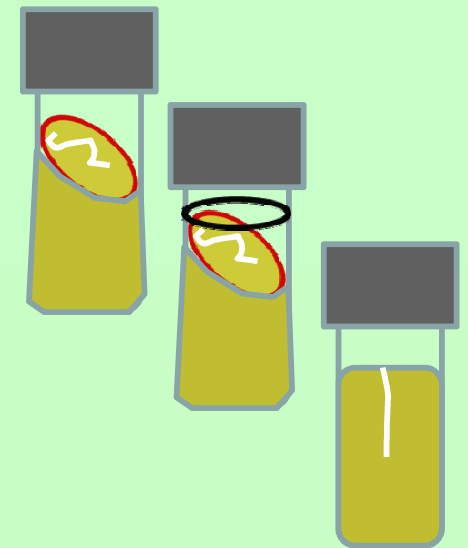
-ferdeagar kémcsőben (+olaj)

-szúrt agar kémcsőben (anaerobok)

-petricsészés agaron

- fagyasztva (-150°C, folyékony nitrogén -193°C)

-inaktív formában: spórák, szaporítóképletek



# Időszakos átoltás



# Liofilezés





# Tartósítás mélyhűtéses fagyasztással



# Mikrobiológiai módszerek

## Törzsfejlesztés mutációval

Az élőszervezet képességeit a genomja határozza meg → a fejlesztéshez genomot kell módosítani → mutáció

Fizikai mutagének:

-besugárzás - UV, gamma, Röntgen;  
dózis (intenzitás x idő)

Kémiai mutagének:

-DNS-t megváltoztató anyagok,  
dózis (koncentráció x idő)

Some common chemical mutagens.

Class of chemicals	Chemical mutagen
I Aziridines	1. Ethyleneimine
II Mustards	2. Nitrogen mustard
	3. Sulphur mustard
III Nitrosamines	4. Dimethyl nitrosamine
	5. Nitrosoguanidine
	6. Nitroso methyl urea
IV Epoxides	7. Ethylene oxide
	8. Diepoxybutane
V Alkyl sulphonates	9. Diethyl sulphonate
	10. Methyl methane sulphonate
	11. Ethyl methane sulphonate
VI Miscellaneous	12. Nitrous acid
	13. Maleic hydrazide
	14. Hydrazine
	15. Hydroxylamine

1. Mutáció

2. mutánsok kitenyésztése (izolálása)

3. mutánsok szűrése (ki lett jobb)

4. kicsit jobbak újra mutáltatása



# Mikrobiológiai módszerek

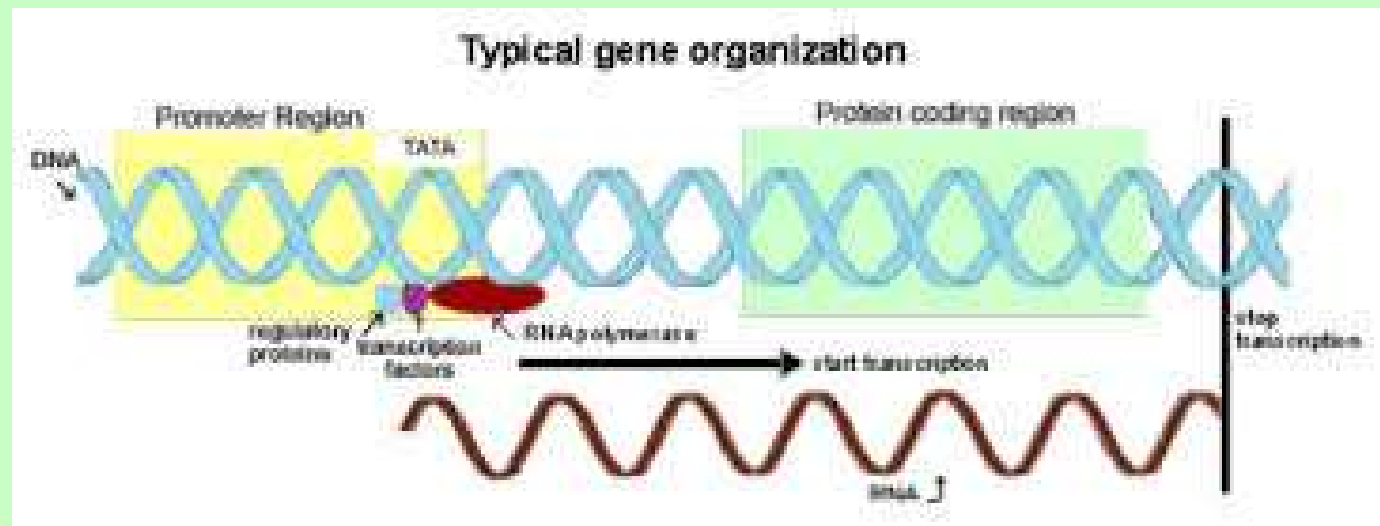
## Törzsfejlesztés gén manipulációval

Az élőszervezet képességeit a genomja határozza meg → a fejlesztéshez genomot kell módosítani → molekuláris biológiai beavatkozás DNS szinten

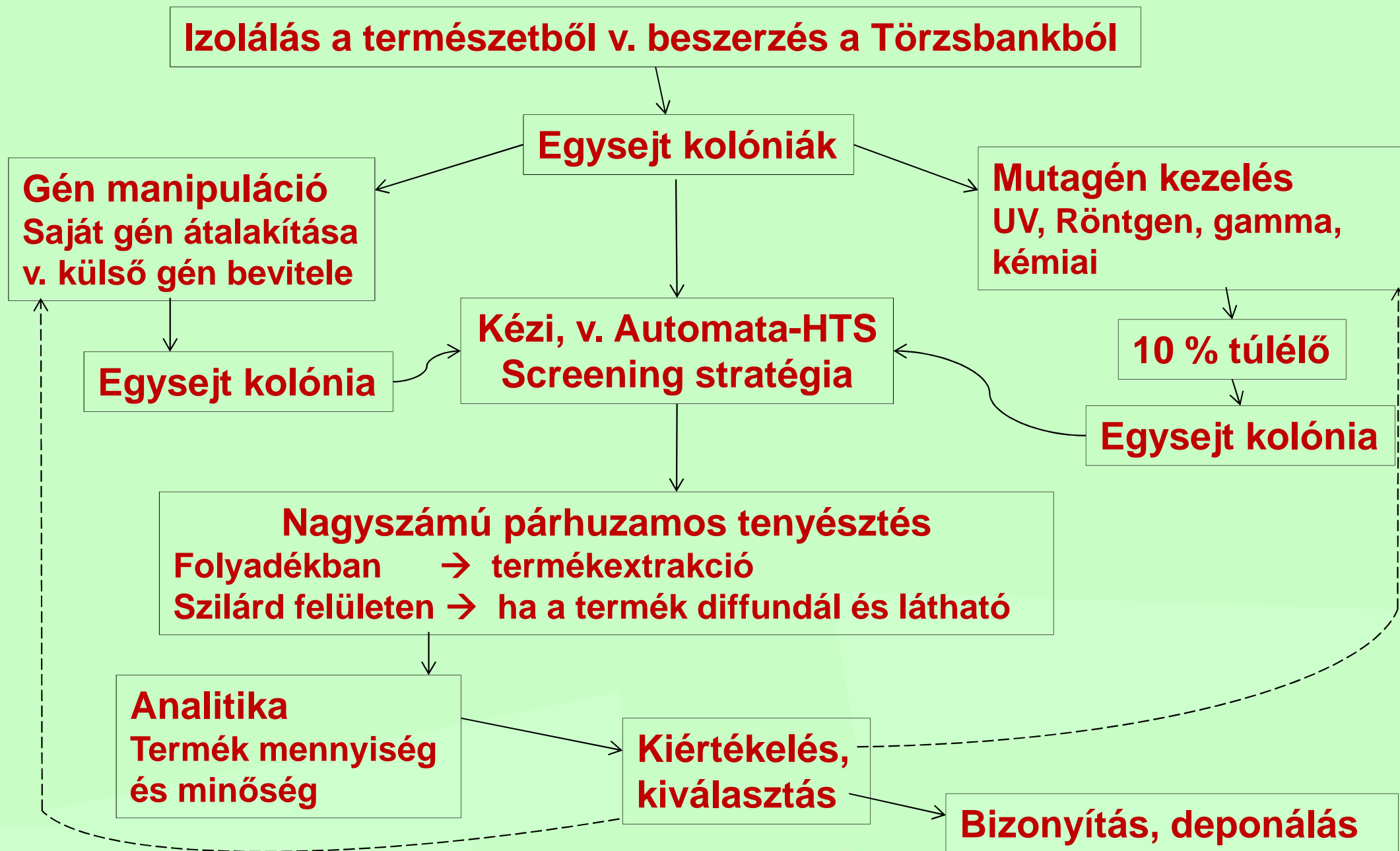
Új gén bevitele: plazmidba v. kromoszómába

Meglévő gén átalakítása: deléció, inzerció, szintetikus gén bevitel

Promoterek befolyásolása: aktiválása (m-RNS szintézis növelése)  
elnyomása (m-RNS szintézis csökkentése)



# Mikrobiológiai módszerek: Összefoglalás



# Általános felszerelések egy mikrobiológiai laboratóriumban

- Sterilfülke
- Tápoldatok
- Tenyésztőedények
- Hűtők
- Folyékony nitrogén
- Centrifugák
- Termosztát
- Kacs, szélesztő bot
- Pipetta
- Autokláv
- Hőlégmenterilező
- Fagyasztókapszula
- Mikroszkóp
- ELISA-reader



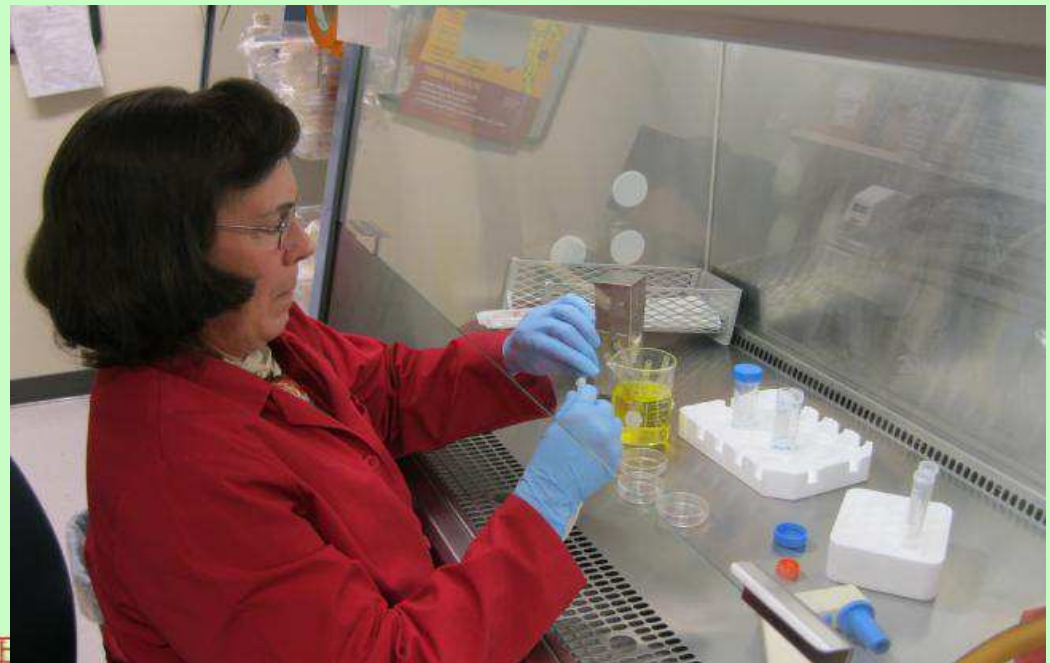
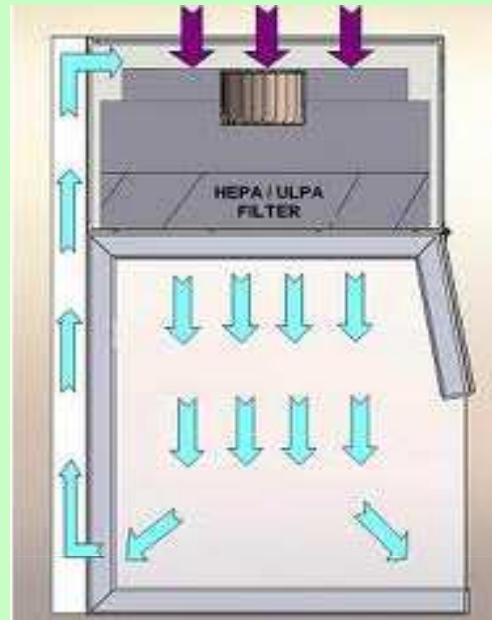
**CO<sub>2</sub> termosztát emlős sejt tenyésztéshez**  
**37°C**  
**5% CO<sub>2</sub>**  
**100% páratartalom**



# Steril munkavégzés

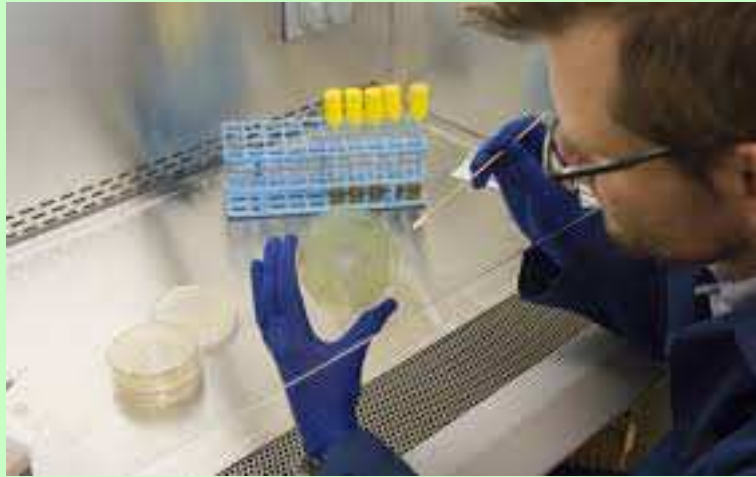
HEPA (high efficiency particulate air ) filter  
99.99%-ban kiszűri a  
levegőből a 0.2 mikron  
méretű részecskéket.

A szűrt levegőt a rendszer  
folyamatosan áramoltatja  
a munkafelületen.



# Tenyésztőedények baktériumokhoz, élesztőkhöz, gombákhoz

## Petri-csészék



## Flaskák



# Tenyésztőedények emlős sejtekhez

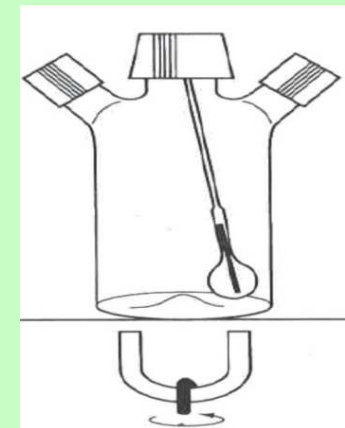
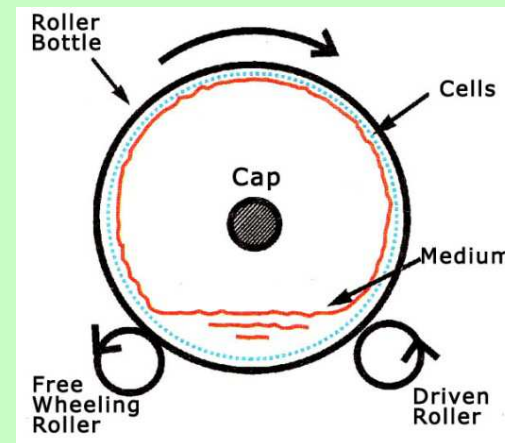


- Petri-csészék
- Többlyukú lemezek (plate)
- T- Flaskák
- Rázott lombikok



Roller flaskák

Spinner flaskák





# Mikroszkópok

A sejtek növekedésének vizsgálata

A sejtszerkezet vizsgálata

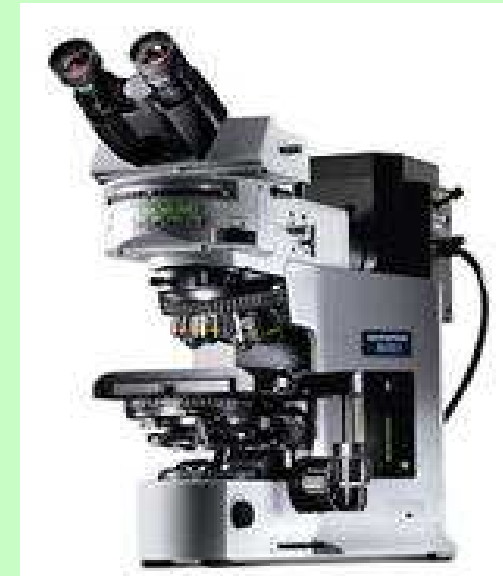
A sejt életképesség vizsgálata

Fertőzések kiszűrése

Sejtszámolás

Festési eljárások

Transzfekció ellenőrzése

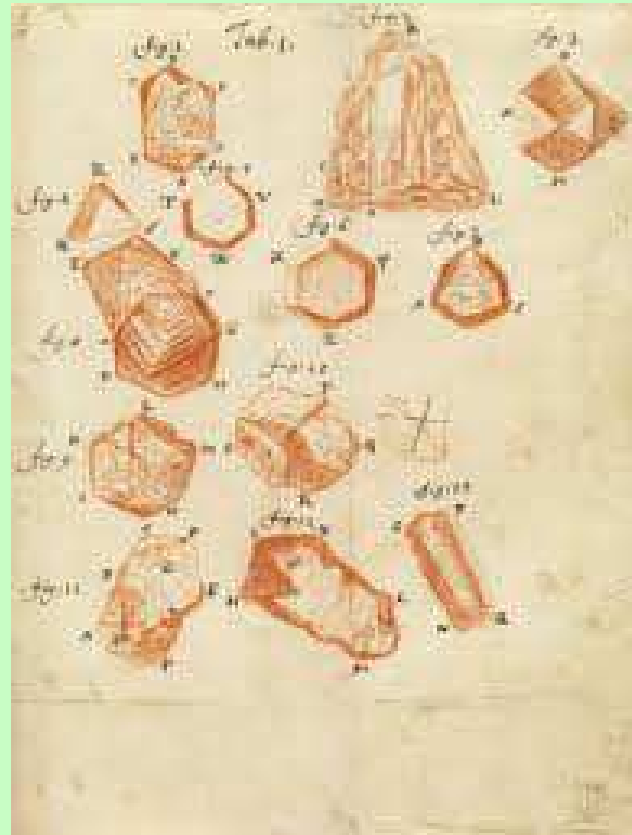
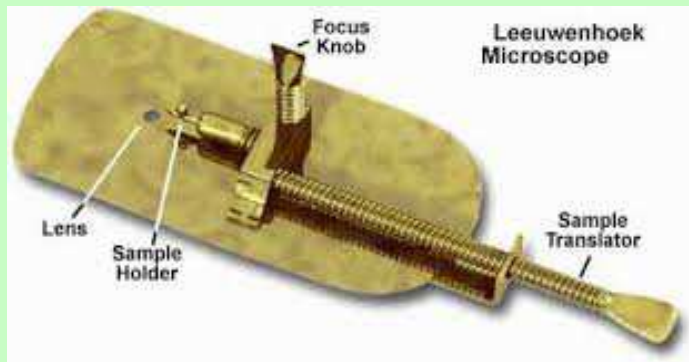


# Mikroszkóp

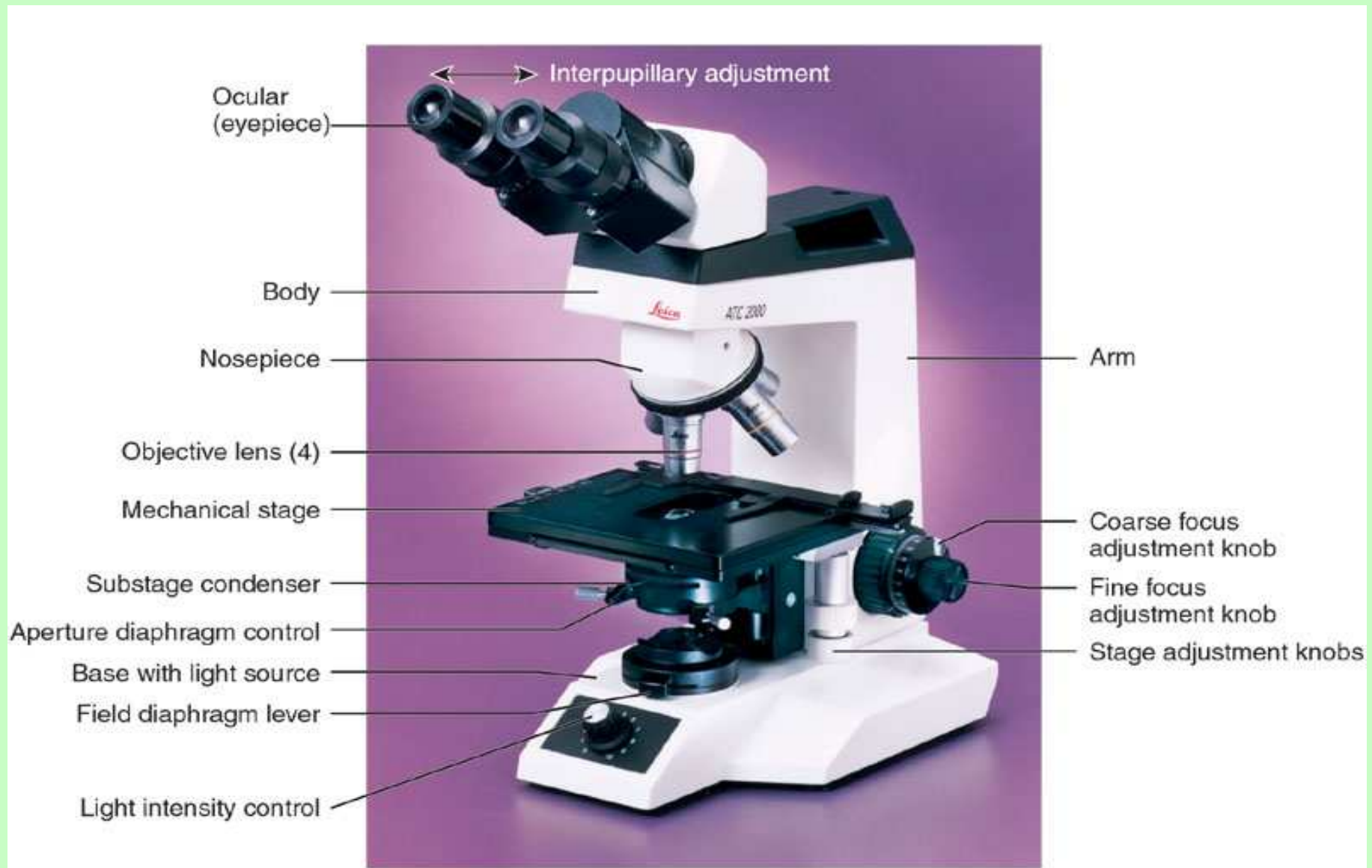
**Anton van Leeuwenhoek (1632-1723)**

**Elsőként észlelt szabad szemmel nem látható képleteket és élőlényeket kb.1674**

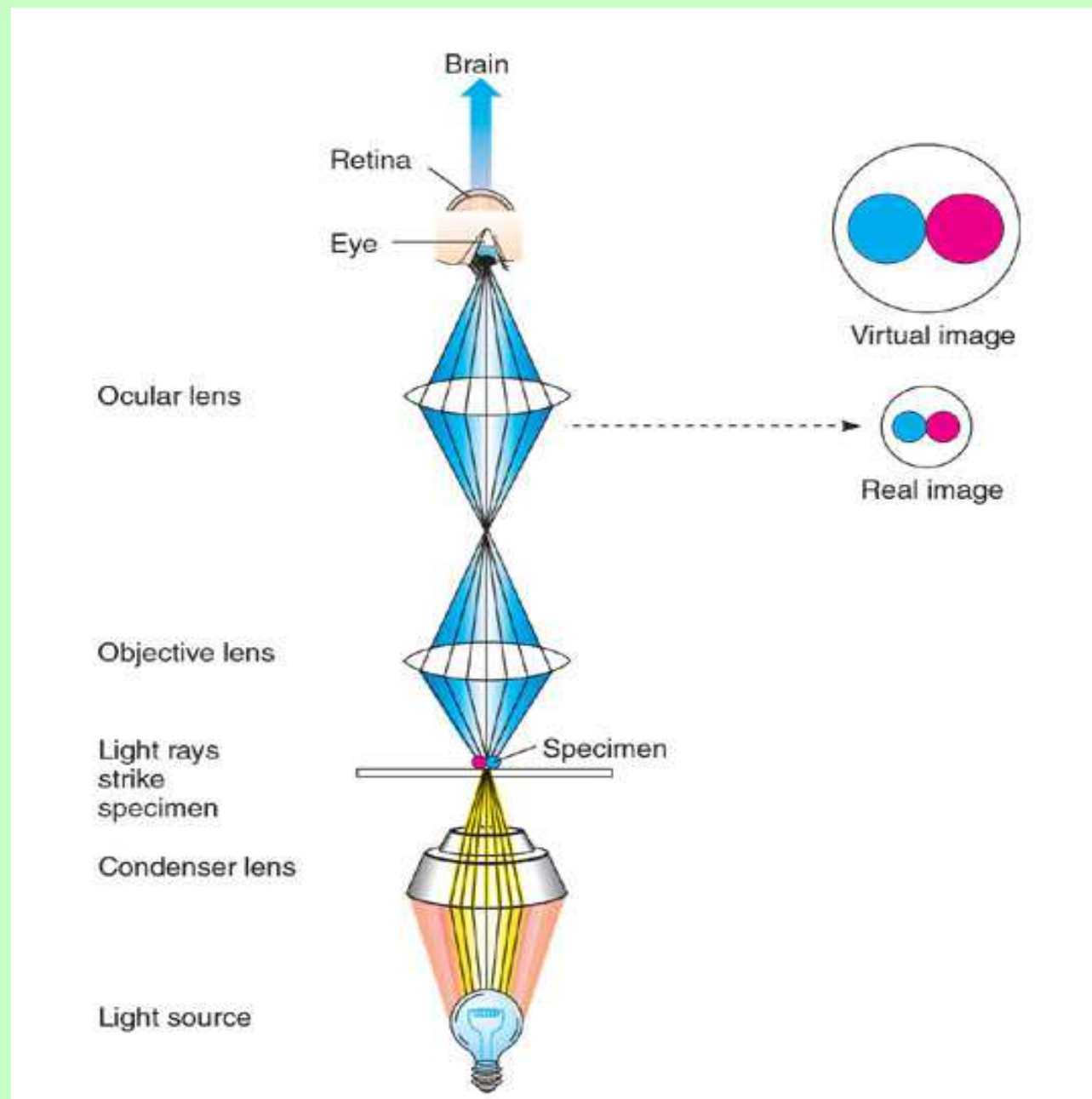
**Az általa elért nagyítás 300X**



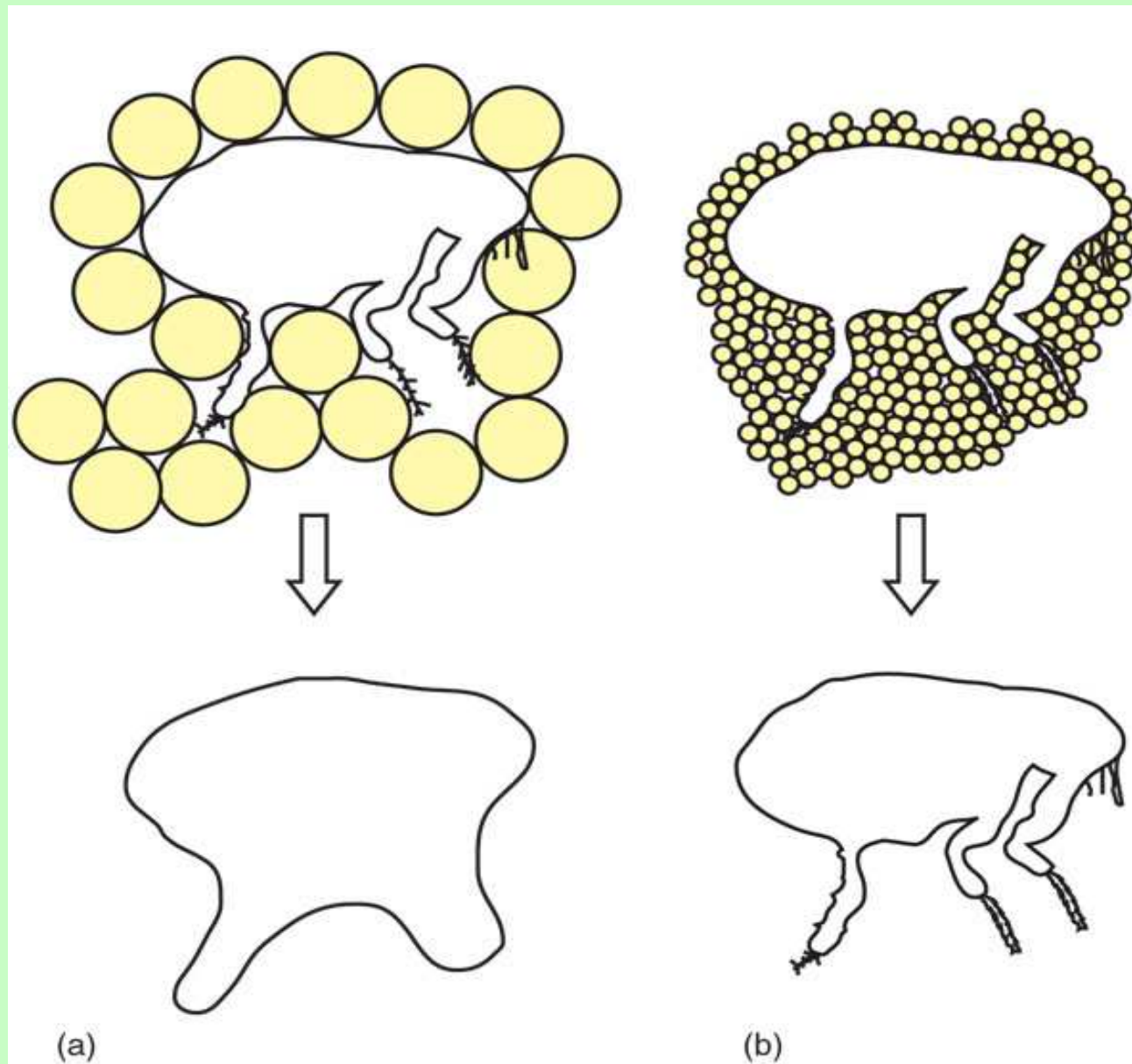
# Fénymikroszkóp



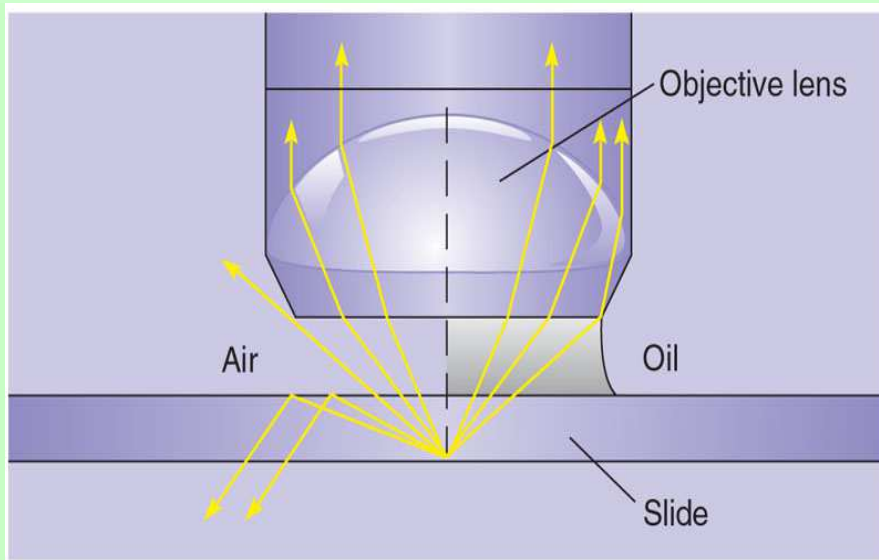
# A fény útja



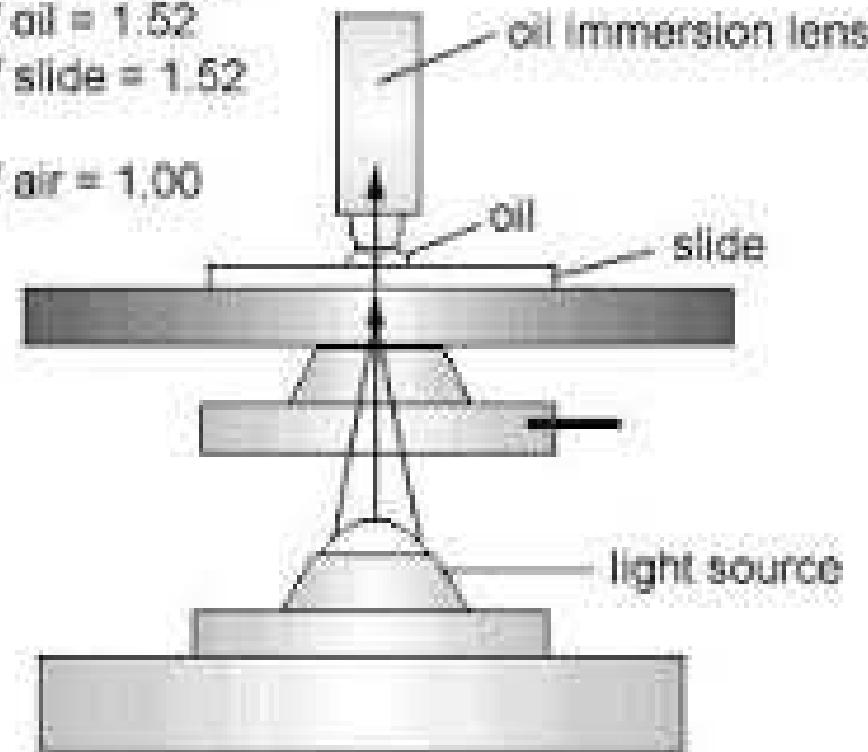
# A hullámhossz hatása a felbontásra



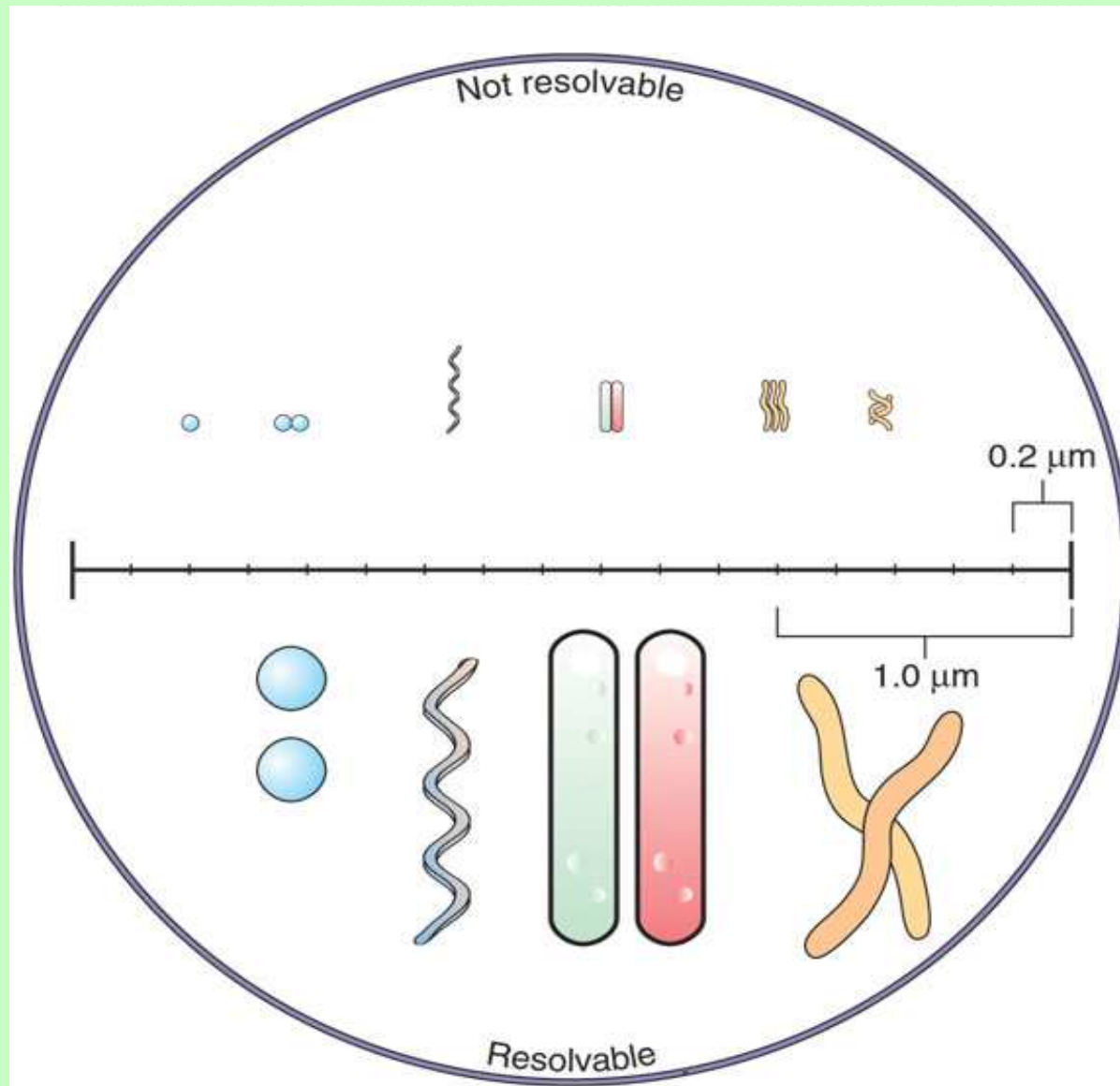
# Olaj immerziós lencse



R.I. of lens = 1.52  
R.I. of oil = 1.52  
R.I. of slide = 1.52  
  
R.I. of air = 1.00



# A nagyítás hatása



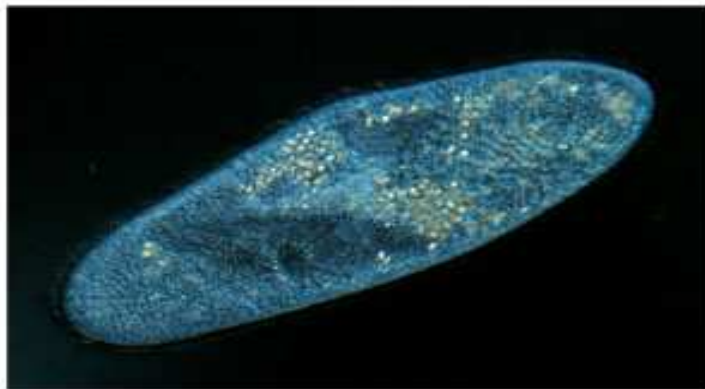
**5X különbség**



# A fénymikroszkóp típusai



(a)



(b)



(c)

**Világos látóterű – a legáltalánosabban használt módszer, a tárgy sötétebb, mint a környező látómező**

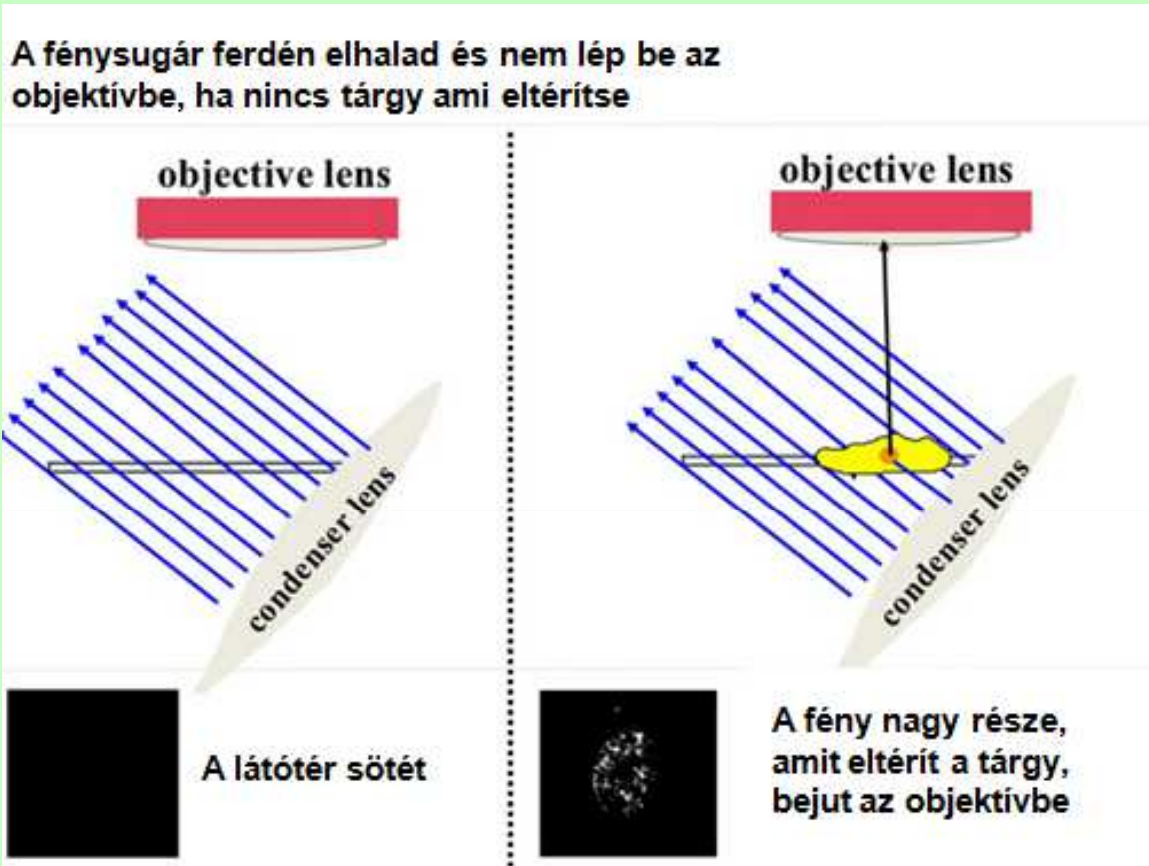
**Sötét látóterű – világos tárgy a sötét látómezőben**

**Fáziskontraszt – a tárgyon áthaladó fény hulláma finom fázis változást szenved, amelyet a mikroszkóp fényintenzitásbeli különbséggé alakít. A legjobb intracelluláris szerkezetek vizsgálatára.**





# A sötétlátóterű mikroszkóp

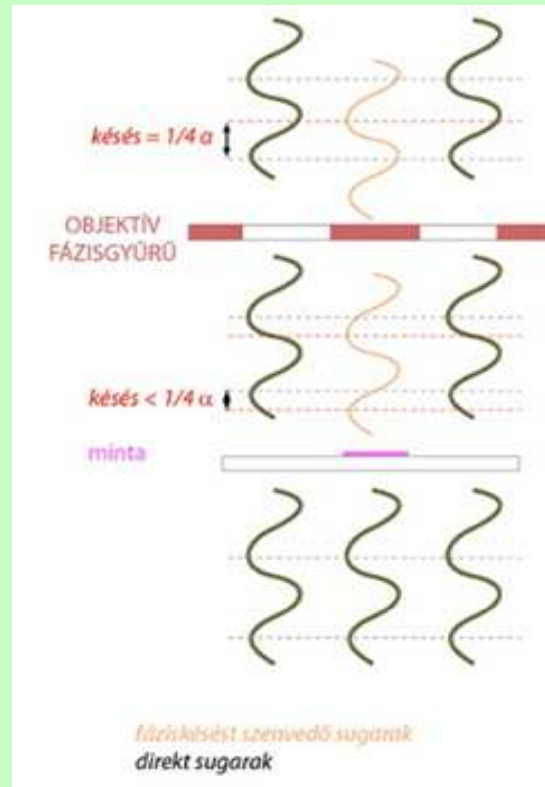


**A sötét látóterű mikroszkóp működésének alapja:**

**a kondenzor speciális rekesze (diafragmája) azokat a sugarakat szűri ki, amelyek az objektívbe jutnának, így csak a tárgy pontjain szóródó fénysugarak vesznek részt a kép kialakításában**

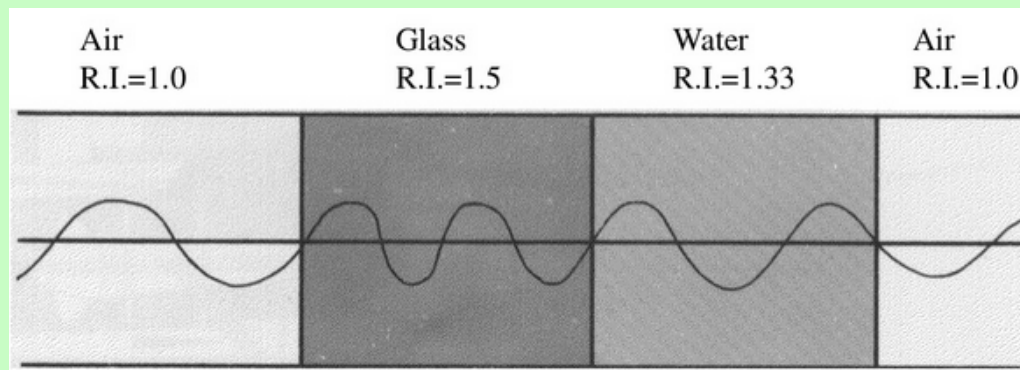
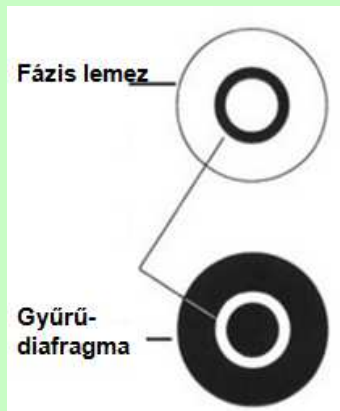


# A fáziskontraszt mikroszkóp működése

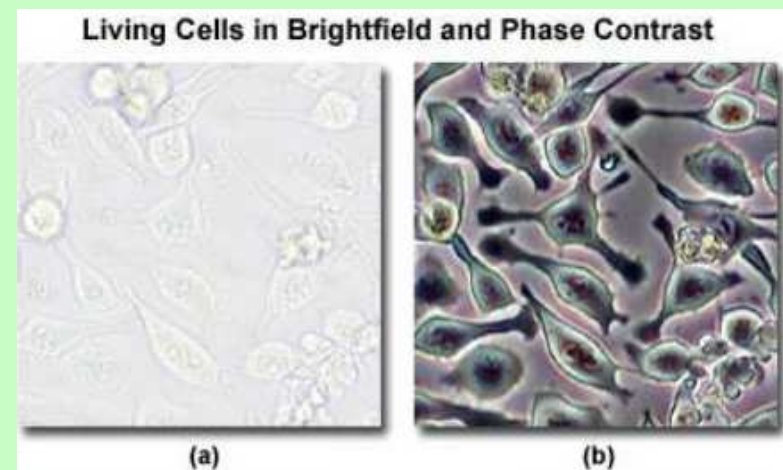
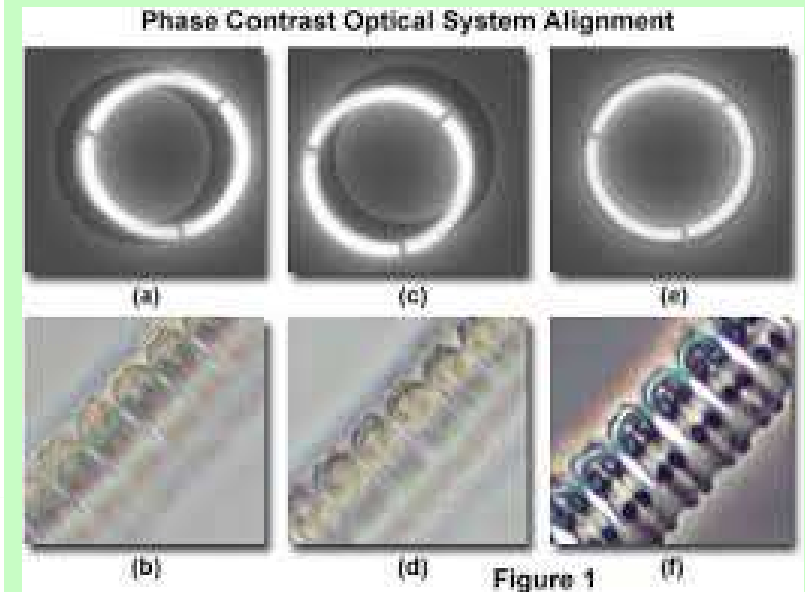
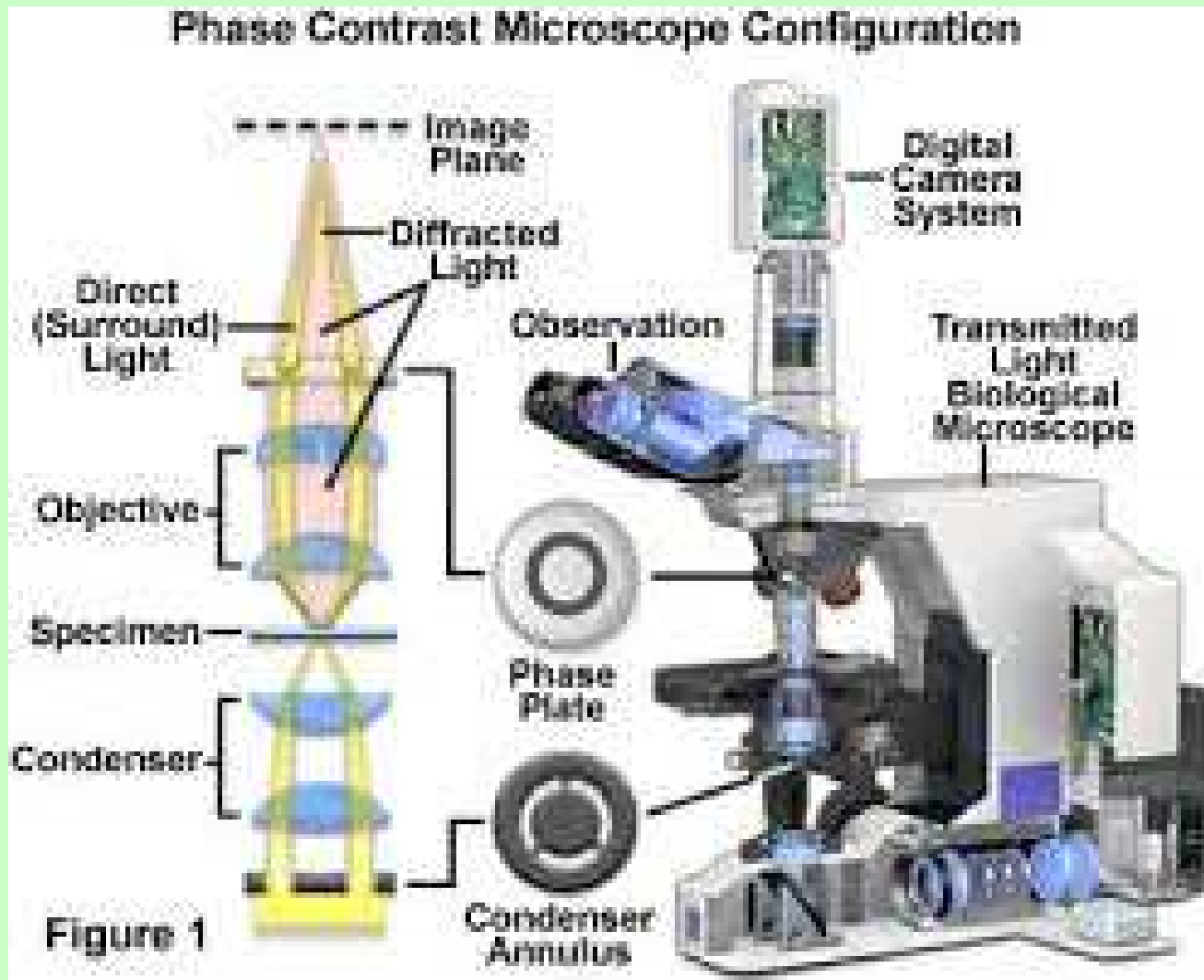


Egyes, a fényforrásból a kondenzoron át érkező sugarak a mintán fáziskésést szenvednek, amit az objektív fázislemeze megnövel.

A késést nem szenvedő és a késő sugarakat az objektív fókuszálja: itt a fellépő interferencia következtében a találkozó hullámok vagy kioltják, vagy erősítik egymást, ennek hatására erős kontraszt alakul ki.



# A fáziskontraszt mikroszkóp működése

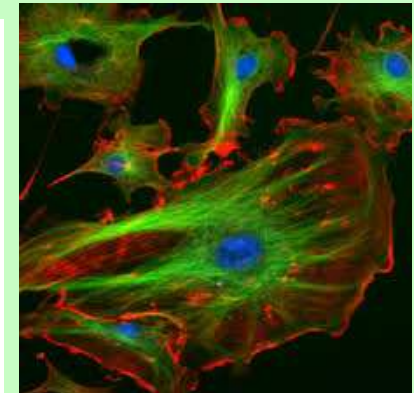
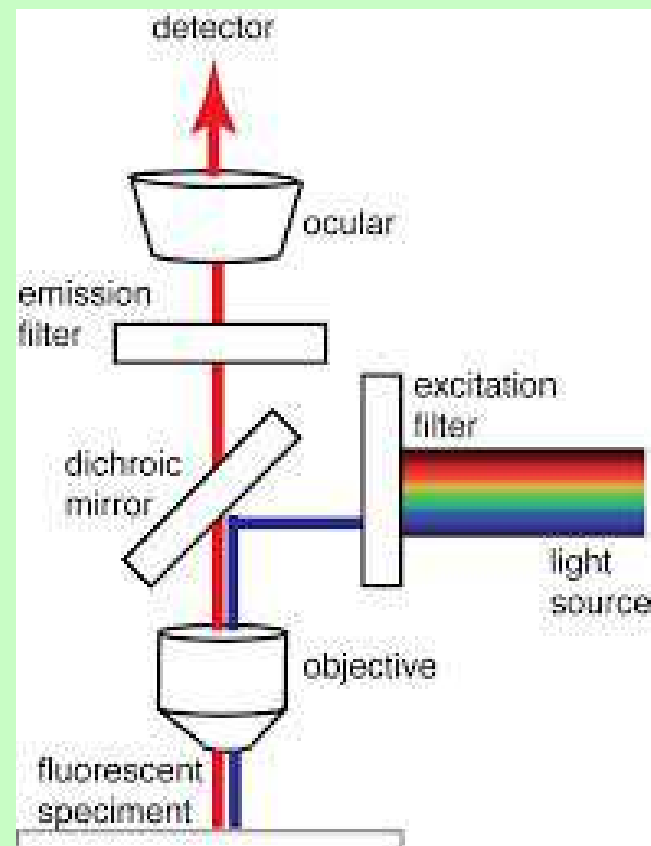
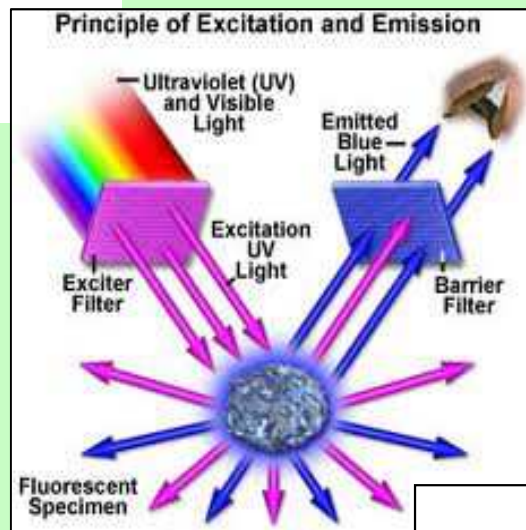
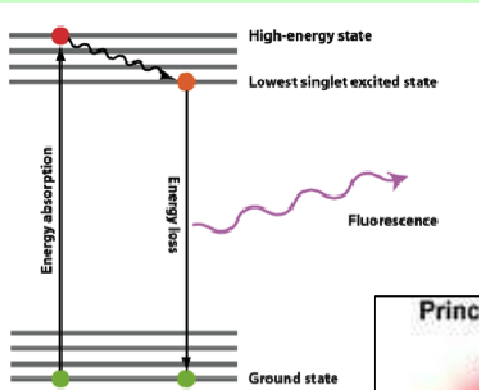


# A fluoreszcens mikroszkóp működése

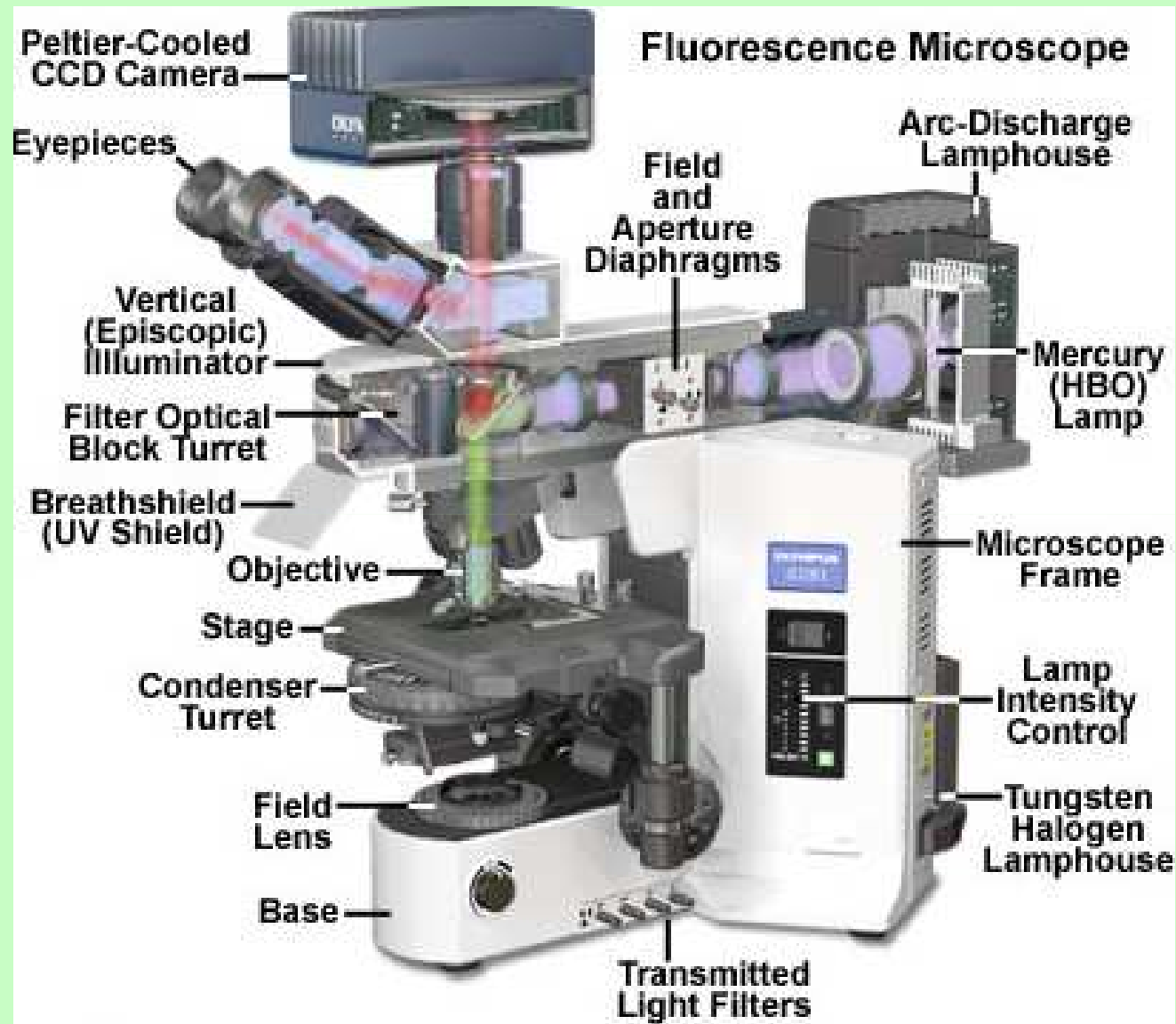
Ultraviola sugárforrással ellátott mikroszkóp, amely a szem védelmére szolgáló szűrővel is rendelkezik.

Olyan festékeket használ, amely látható fényt sugároz, ha rövid hullámhosszú UV fénnel való besugárzást kap.

Különösen fertőző betegségek diagnosztikájában hasznos

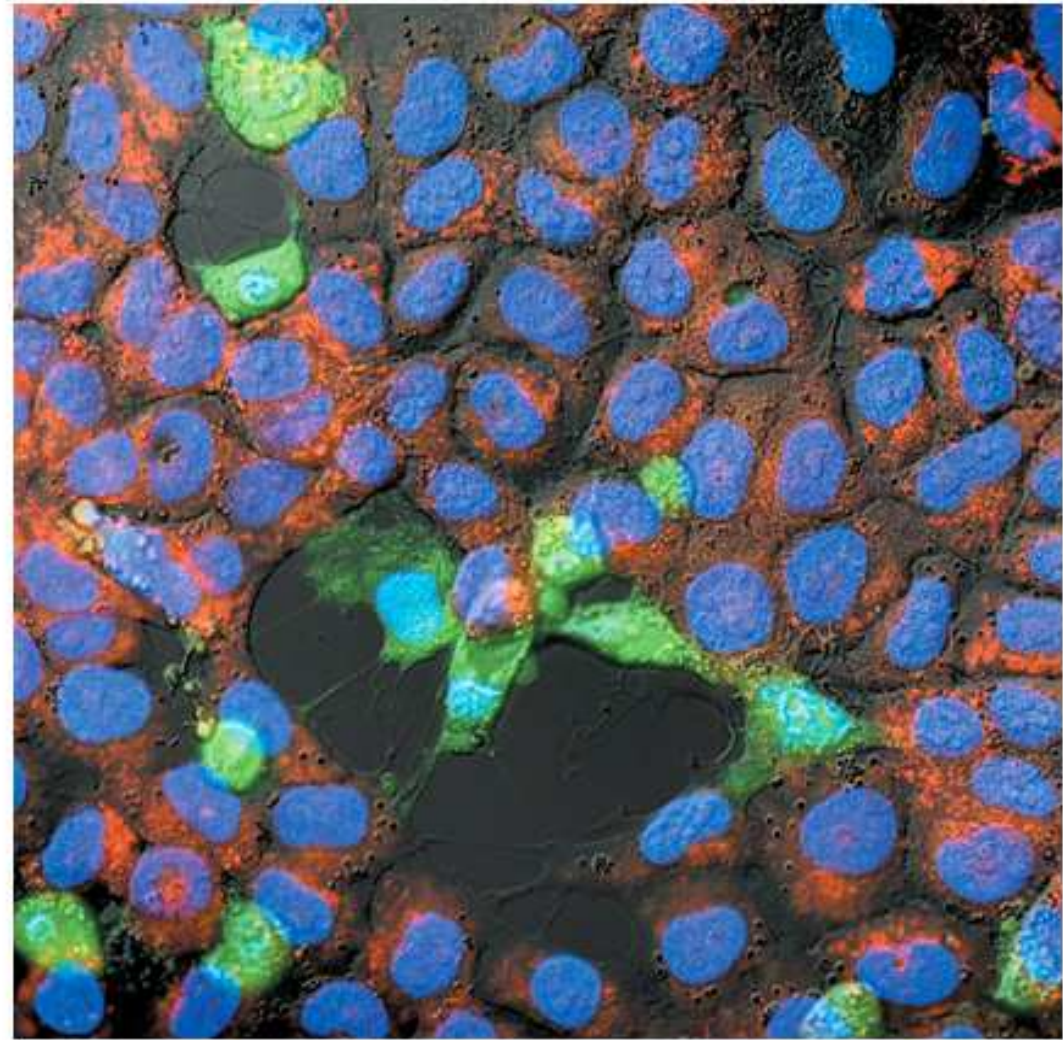


# A fluoreszcens mikroszkóp



# A fluoreszcens festékek

- **Hoechst 33342:kék**
  - szelektív nukleáris festék
  - kromatin kondenzáció, fragmentáció
- **Bis-L-aszpartát amid (caspase 3 szubsztrát): zöld**
- **TMRE: mitokondrium polarizáció : piros**

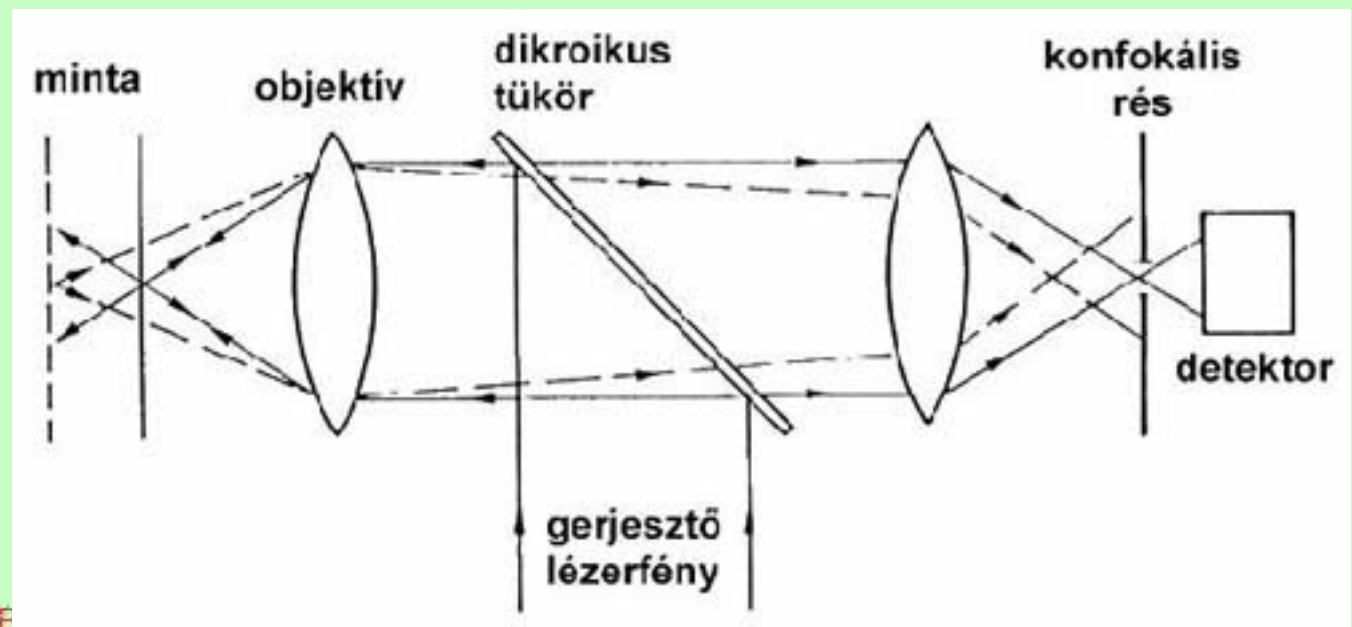


# A konfokális mikroszkóp

A konfokális mikroszkóp fluoreszcensen jelölt minták vizsgálatára alkalmas. A hagyományos mikroszkópokkal szemben, ahol a minta egy területét éri a megvilágítás, a konfokális mikroszkópnál egyszerre csak a minta egy pontját világítják meg, így a konfokális elrendezés önmagában nem ad képet.

A pásztázó nyaláb végig megy a vizsgálandó felületen (beam scanning), épp úgy, ahogy az elektronsugár a tévéképernyőn. A detektor minden egyes pontban megméri a fény intenzitását. A kapott digitális kép számítógéppel kezelhető és elemezhető.

Több szelet képét összerakva a fluorofór térbeli elhelyezkedése is vizsgálható. A konfokális képalkotás lényege, hogy a rendszer csak a fókusz síkból jövő fényt detektálja.



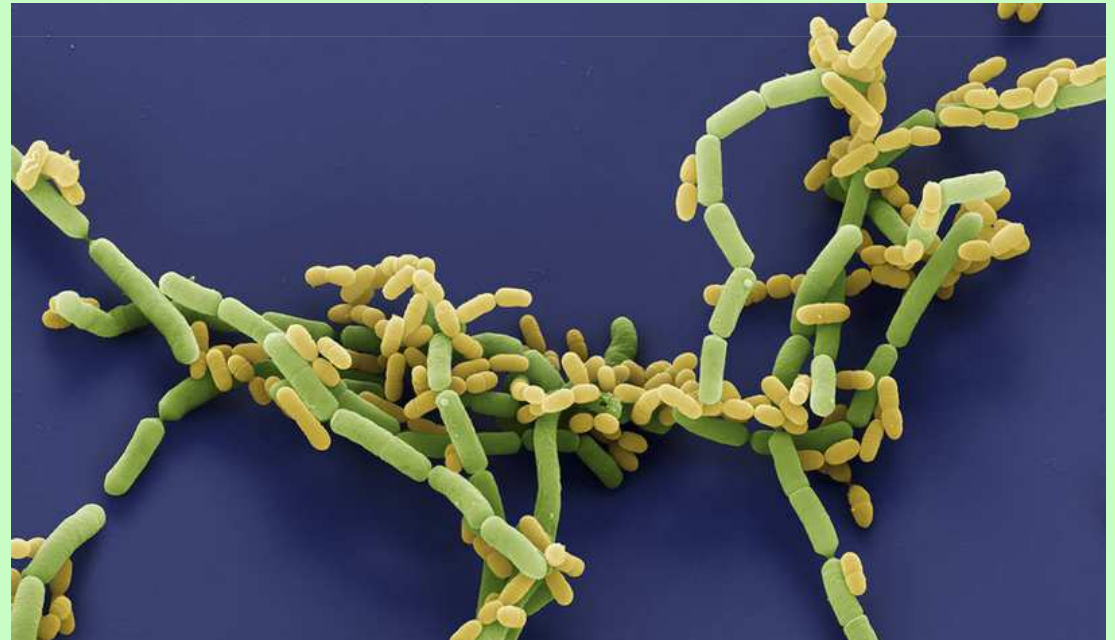
## Az elektron mikroszkóp

A képképzést elektronnyaláb végzi, amely felgyorsított állapotban hullámszerűen halad át a mintán, v. verődik vissza a mintáról.

Az elektron hullámok 100,000X rövidebbek, mint a látható fény hullámai.

Az elektronnyaláb nagyon részletes képet tud adni egészen kicsiny struktúrákról is, mert a felbontás a hullámhossztól függ.

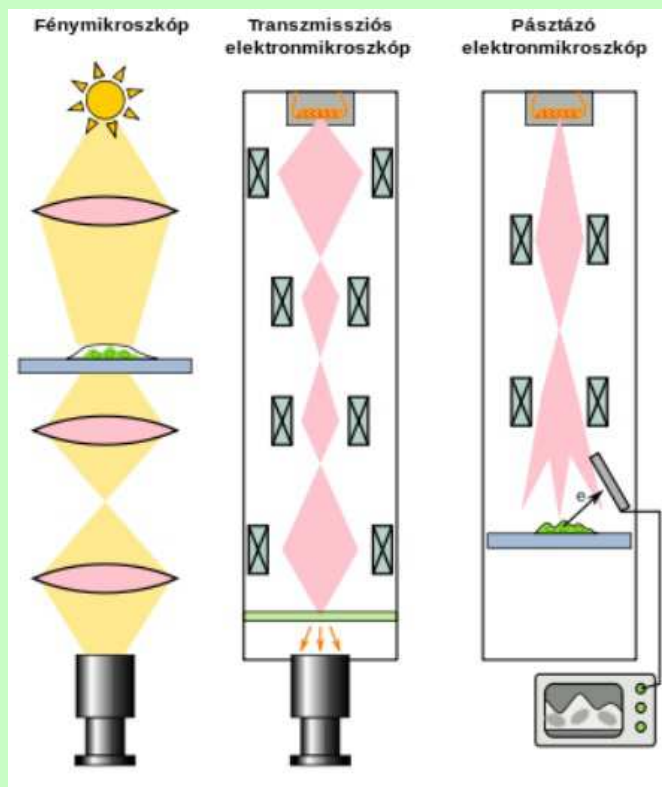
A nagyítás 5,000X és 1,000,000X tartományban van.





# Az elektron mikroszkóp

Két fajtája van:



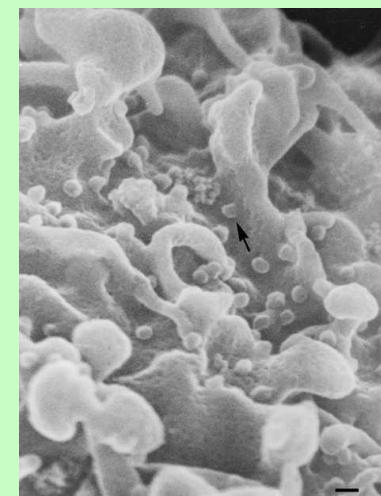
Átvilágító elektron mikroszkóp

Transmission electron microscopes (TEM)

Pásztázó elektronmikroszkóp

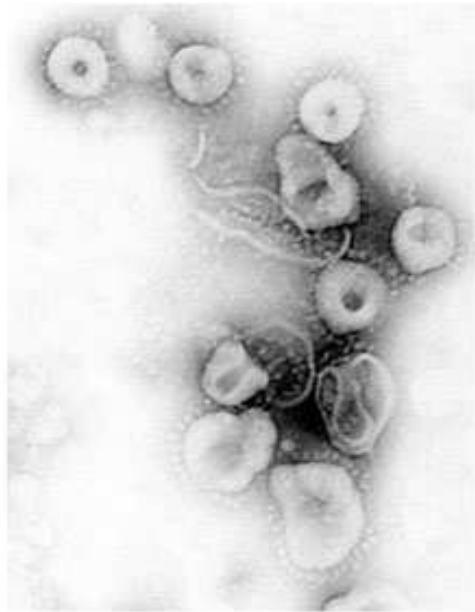
Scanning electron microscopes (SEM)

**Pásztázó EM (SEM) kép limfocita sejtfelszínén található HIV vírusokról (pl. nyílnál)  
A mérő szakasz 100 nm, Nagyítás  $\times 50,000$ .**



# Átvilágító elektron mikroszkóp

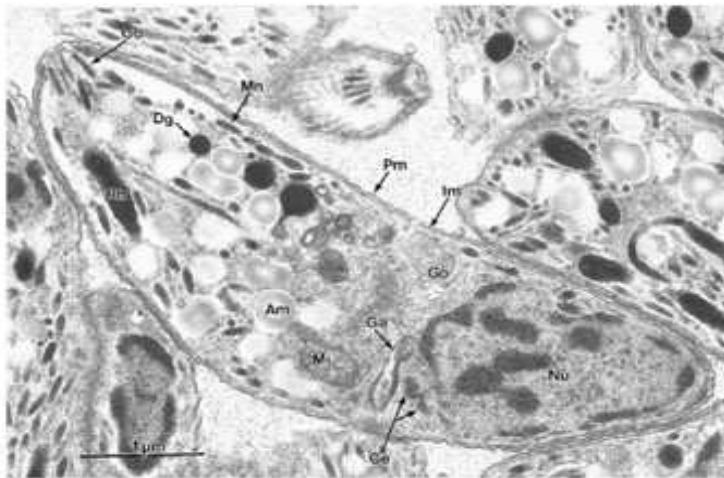
## Transmission electron microscopes (TEM)



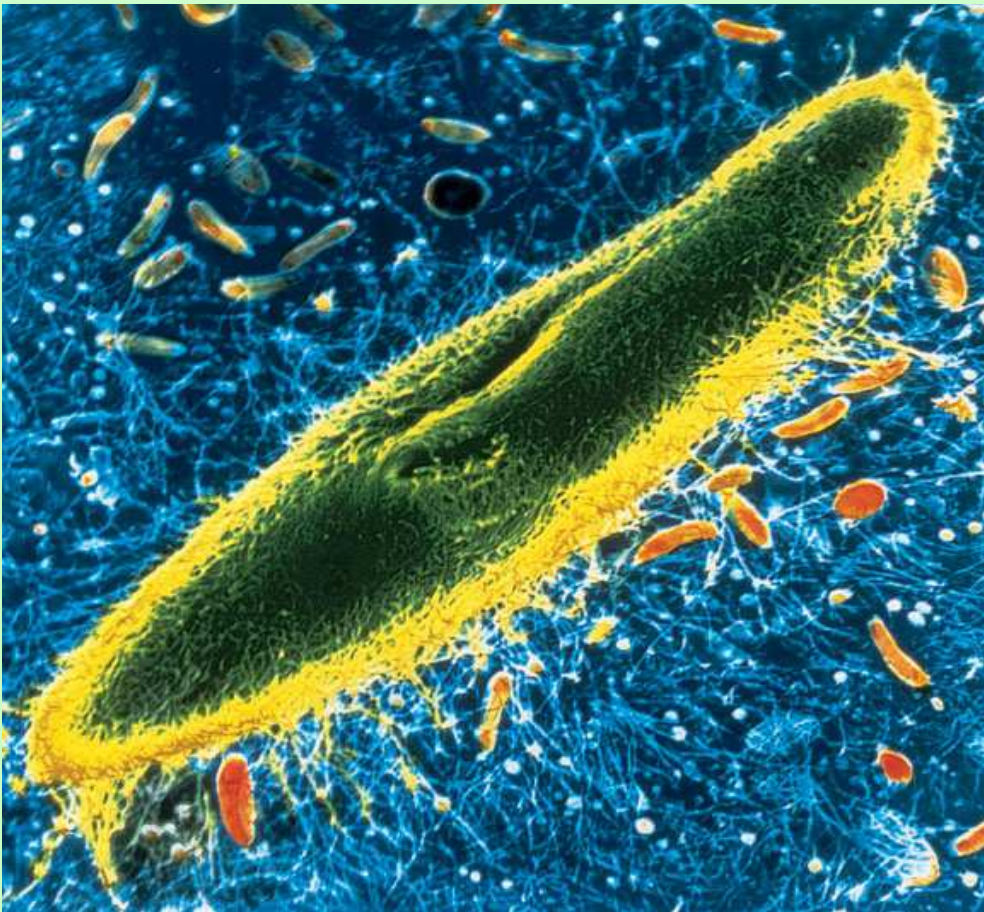
A TEM magas feszültségű elektronsugarat használ, amelyet egy katód bocsájt ki. Az elektronsugár részlegesen áthatol a vékony mintán, bizonyos helyeken elnyelődik, így hordoz információt a tárgyról.

A „kép” nagyítását a mágnesekkel fókuszálható elektronnyalábok adják, amelyek végül fluorescens ernyőhöz, fotólemezhez, vagy fényérzékeny érzékelőkhöz (pl. CCD kamera) ütközve alakítják ki a képet.

A vastagabb részek sötétebbek, a vékonyabb részek világosabbak lesznek.



# Pásztázó elektronmikroszkóp - Scanning electron microscopes (SEM)



A SEM esetében egy vékony elektronsugár bombázza ide oda pásztázva a fémfüsttel előzőleg beborított minta felületét.

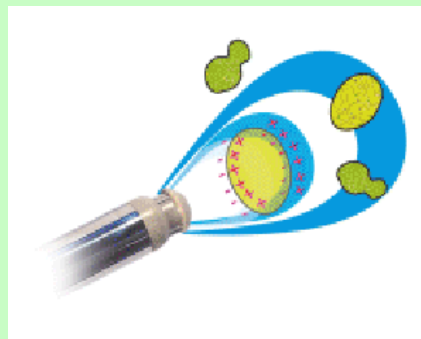
A TEM-el szemben itt nem a primer elektronnaláb, hanem a felületről emittált (a primer elektronok által kiütött) szekunder elektronok alkotják a képet.

A primer elektronnaláb helyzete és az abban a helyzetben - a szekunder elektronok által gerjesztett - jel tárolásra kerül, amíg a teljes raszteren végig megy a primer sugár. A jelekből részletes 3D kép állítható össze.



# Sejtszámlálási módszerek

1. OD-optikai sűrűség (VIS fotométer, 600-660nm)
2. Turbidimetria (online)
3. Mikroszkóp – sejtszámlálás Bürker kamrával ( $10^6$  db/ml)
4. Cellcounter ( $10^6$  db/ml) (kapillárisba felszívott, és ablak előtt elhaladó sejtek számlálása lézerrel)
5. Sejt szárazanyag mérés (1-10 g/L) (Szűrés után szárítás  $105^{\circ}\text{C}$ -on)
6. Hígítási szélesztési módszer (CFU/ml) (Megfelelő hígításban a Petri csészén lévő telepek számolása)
7. Kapacitancia mérésen alapuló sejtkonc. mérés



# Sejtszámolás Bürker kamrával

A sejtekkel végzett munka napi rutin része a sejtek számlálása és életképességük vizsgálata. Tripánkék festékekkel megfestve az élő sejteket a halott sejtekbe behatol a festék (kékek lesznek, az élő sejtekbe nem hatol be a festék, így fehérek maradnak).

Bürker vagy Neubauer kamra segítségével egy határozott térfogatban lehet a sejteket megszámlálni.

