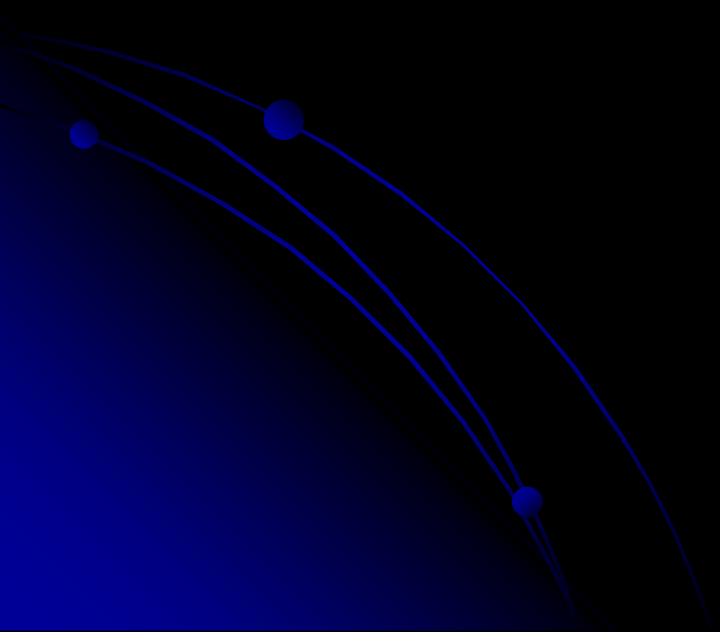
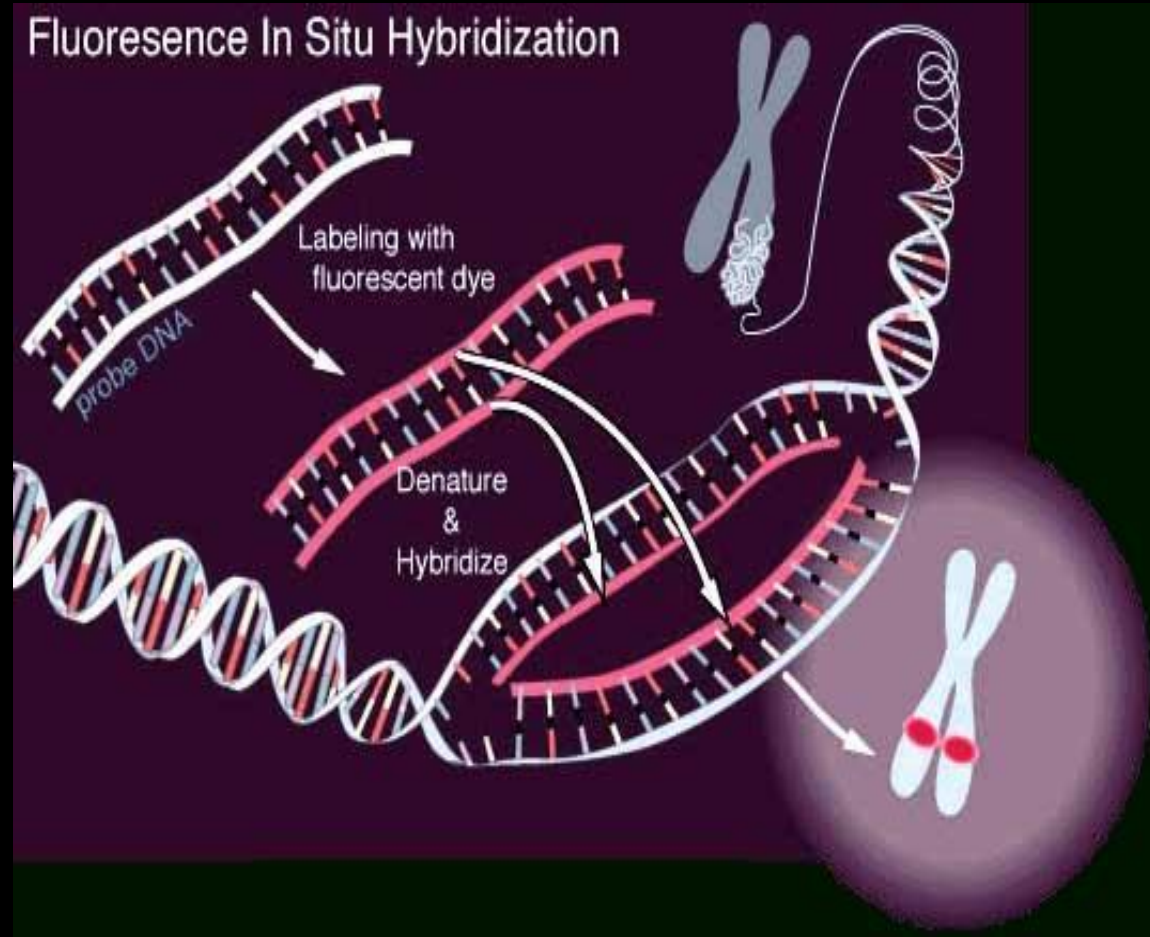


FLUORESZCENS IN SITU HIBRIDIZÁCIÓ



Módszer elve

Fluoreszcens
festéssel jelölt
oligonukleotid
próba a sejt
morfológiájának
változása nélkül
bejut a sejtbe, ahol
specifikusan köt a
komplementer
target
szekvenciához



Alkalmazása

- Mikroorganizmusok gyors és pontos mennyiségi és minőségi meghatározásra alkalmas
- Speciális gének expressziójára
- Morfológiáról, szerkezetről, térbeli elhelyezkedésről ad információt

Alkalmazásának előnyei

- Látható, de nem tenyésztethető mikroorganizmusok vizsgálata
- Lassan szaporodó, többihez képest metabolikus hátrányban lévő sejtek is detektálhatók, bár a fluoreszcencia intenzitása kisebb
- Különböző fluoreszcens festékekkel egyszerre többféle mikróbaközösség vizsgálható
- mRNS-ek hibridizálásával bizonyos enzimek termelését végző sejtek detektálhatók

Alkalmazásának hátrányai

- Lassú anyagcseréjű mikroorganizmusoknál kis intenzitású jelet kapunk
- Élő és holt sejteket nem tudunk megkülönböztetni
- Mikroorganizmusok és a környezetük (pl.: talaj) autofluoreszcenciája gondot okoz → speciális szűrők
- rRNS háromdimenziós struktúrája miatt a hozzáférés nem azonos valószínűségű
- Festékek fakulása(csökkentése: fakulást gátló anyagok, fotostabil festék: cianin alapú, keskeny sávú filter)

Hibridizáció menete

1. A minta fixálása

- Sejt átjárhatóvá tétele
- Sejt épségének fenntartása
- RNS-ek védelme

2. Speciális mintaelőkészítés, tárgylemezhez rögzítés

- Sejtek bevonóanyaggal kezelt tárgylemezre cseppentés
- **dehidratáció** (alkoholban 50, 80, 100%-os)

Hibridizáció menete

3. Hibridizáció

- A fluoreszcens festékekkel jelölt a komplementer próba mintához adása

4. A nem hibridizált próba eltávolítása mosással

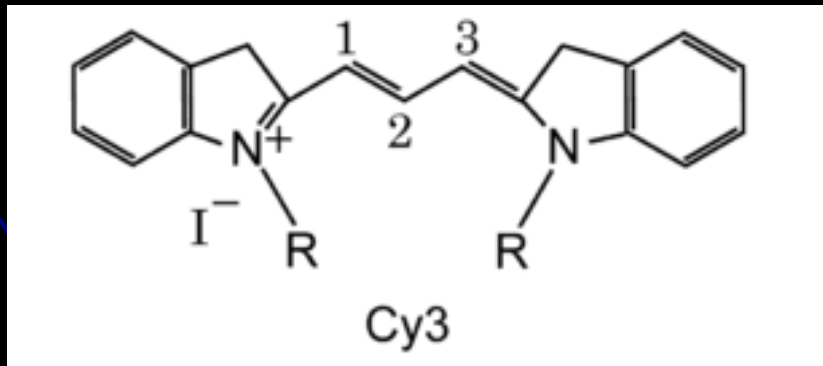
- 48°C-os mosópufferrel, jéghideg csapvízzel mosás, majd szárítás

5. A minták értékelése mikroszkóppal

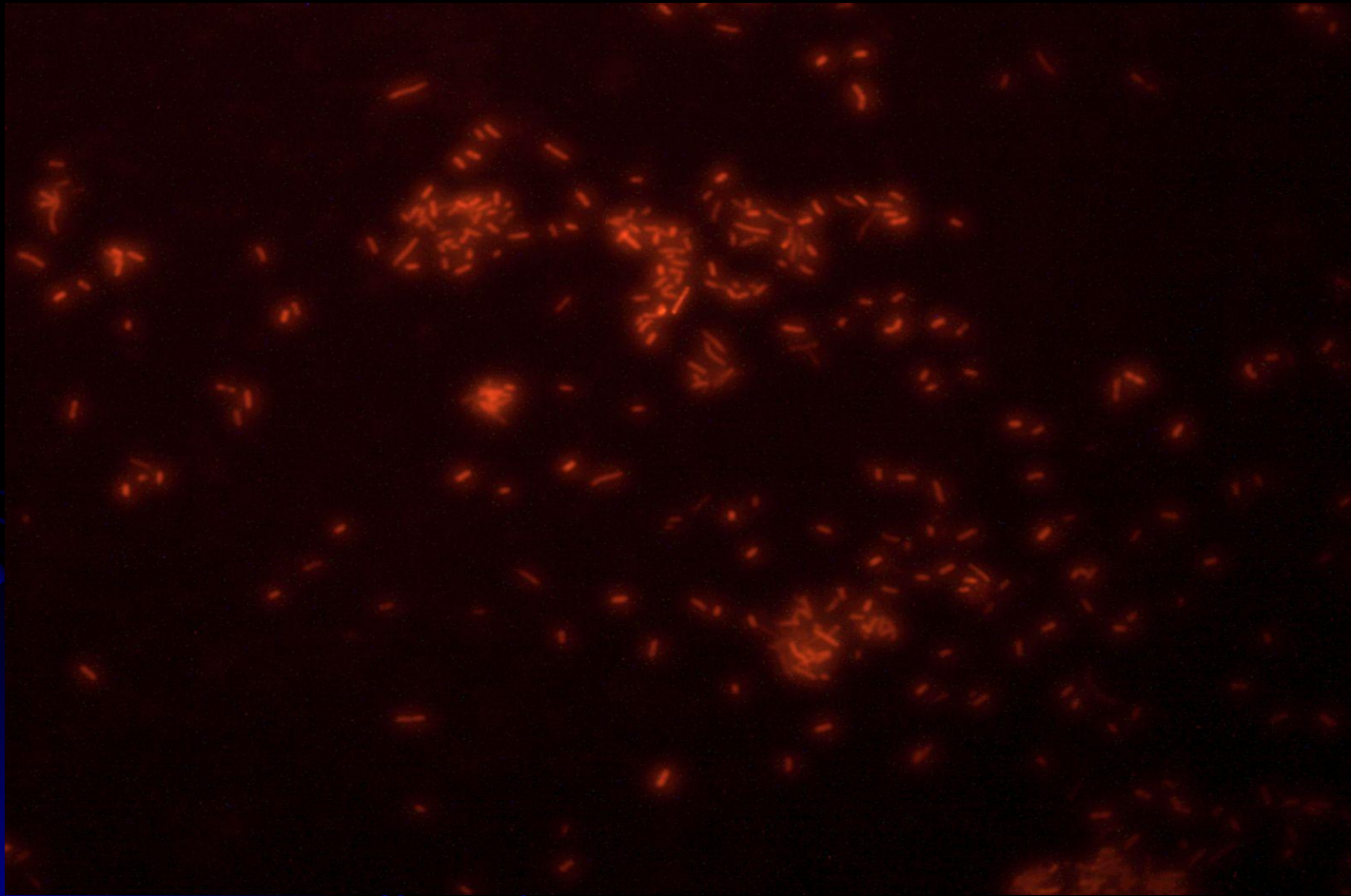
- Keskeny sávú filterrel felszerelt hagyományos mikroszkóppal, kamerával a képek digitalizálása

Fluoreszcens festékek

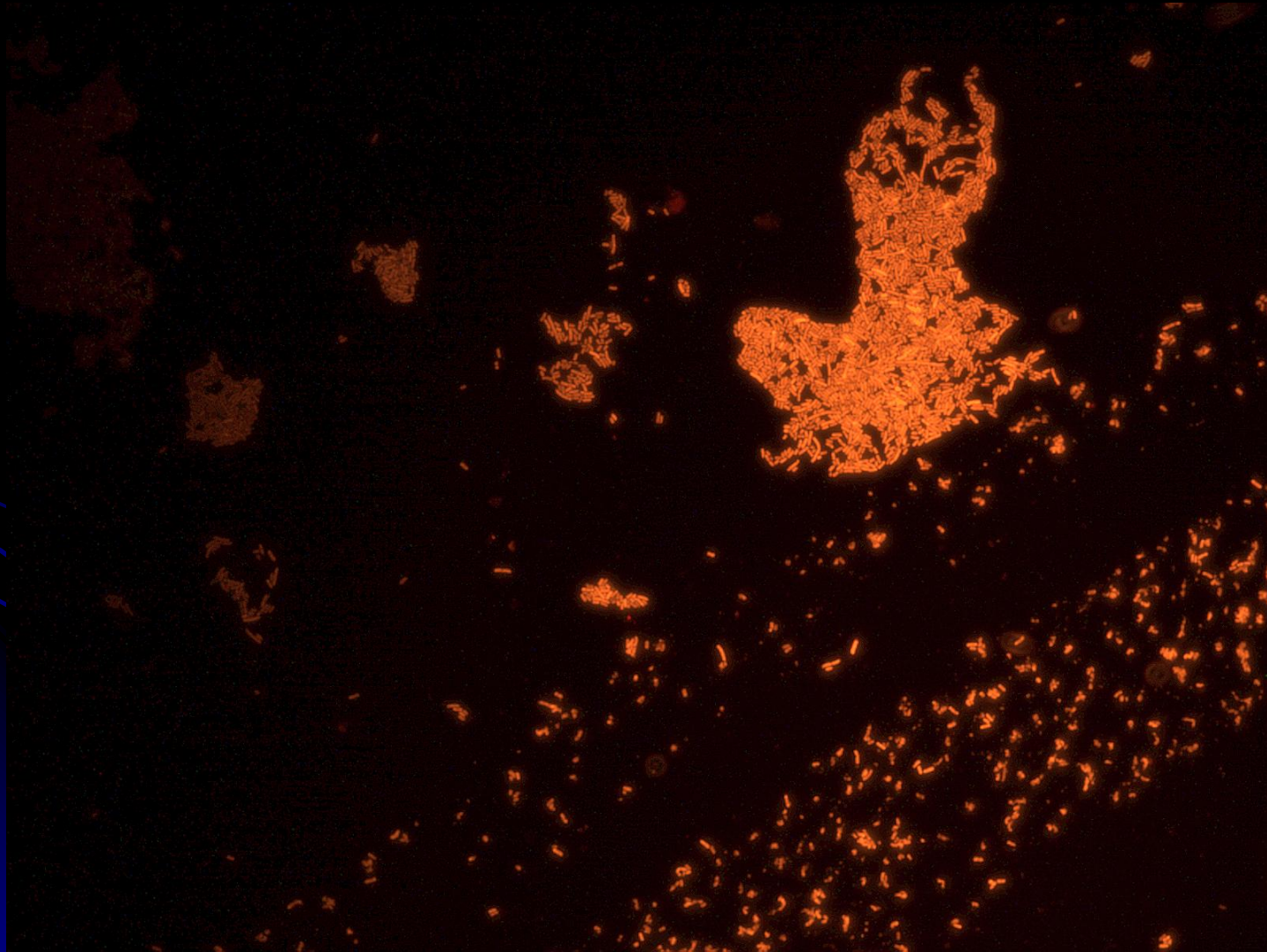
- Fluoreszcein származékok (pl.: fluoreszcein izotiocianát)
- Rhodamin származékok (pl.: tetrarhodamin izotiocianát)
- Cianin származékok: Cy3 – rRNS-hez kötődik, gerjesztés: 550 nm, emisszió: 570 nm



Hibridizált *Escherichia coli*



Hibridizált *Escherichia coli*



T22 (*Saccharomyces cerevisiae*) és *Bacillus cereus* FISH-el

