

ÚJ FÉNYSZERKEZETES MÓDSZER KIDOLGOZÁSA A SZERKEZETEK TÉRBELI REKONSTRUKCIÓ- JÁRA

KISS ÁRON KEVE¹, ÁCS ÉVA ÉS KISS KEVE TIHAMÉR

Kivonat

A jelen dolgozatban egy fénymikroszkópos, nagyfelbontású videomikrográfias módszert ismertetünk, melynek segítségével áteső megvilágítással és DIC kontrasztosítással nagyfelbontású videofelvételek készíthetők, a videóval felvett optikai szeletekből pedig a sejtek / szervezetek háromdimenziós rekonstrukciója készíthető el. A módszer alkalmas az általános sejt szerkezet / testszerkezet térbeli feltárására mozgó élőlényeknél, továbbá számos, az élőlény szempontjából adaptív, ill. ökológiailag releváns funkcionális tulajdonság vizsgálatára.

Bevezetés

Az utóbbi két évtizedben a modern fénymikroszkópos módszerek teljesen új, eddig ismeretlen területekre nyújtottak bepillantást az élettudományok területén. A legfontosabb újítások közé tartozik a fluoreszcens festékek elterjedése, mellyel sejtek, sejt szerkezetek festhetők meg specifikusan, illetve a különböző optikai szeletelési technikák, melyekkel készített optikai szeletekből a vizsgált sejt vagy szövet háromdimenziós számítógépes rekonstrukciója készíthető el. Bár ma már az élettan, immunológia és molekuláris biológia területén általánosan használttá vált, és a kutatás szempontjából gyakran kulcsfontosságú eszközzé lépett elő a modern festési, képrögzítési és képelemzési eljárásokkal felszerelt fénymikroszkóp, a vízi mikroszervezetek felépítésének és ökológiai tulajdonságainak vizsgálata során ezen komoly perspektívával rendelkező módszer használata még szórványos, a benne rejlő lehetőségek még kevésbé ismertek és nem kiaknázottak. Jelen cikkünkben egy fénymikroszkópos videomikrográfias módszert mutatunk be, melynek segítségével nagyfelbontású és nagy kontrasztal rendelkező videofelvételek készíthetők élő szervezetekről, illetve elkészíthető a sejt szerkezet /

¹ aronkevekiss@yahoo.co.uk

testszerkezet általános térbeli rekonstrukciója is. Kitérünk a módszer eddigi eredményes, és további lehetséges alkalmazási területeire, továbbá lehetséges továbbfejlesztési irányaira. A mozgó szervezetek általános térbeli rekonstrukciója egy eddig nem kidolgozott módszertani területet jelent a fénymikroszkópiában.

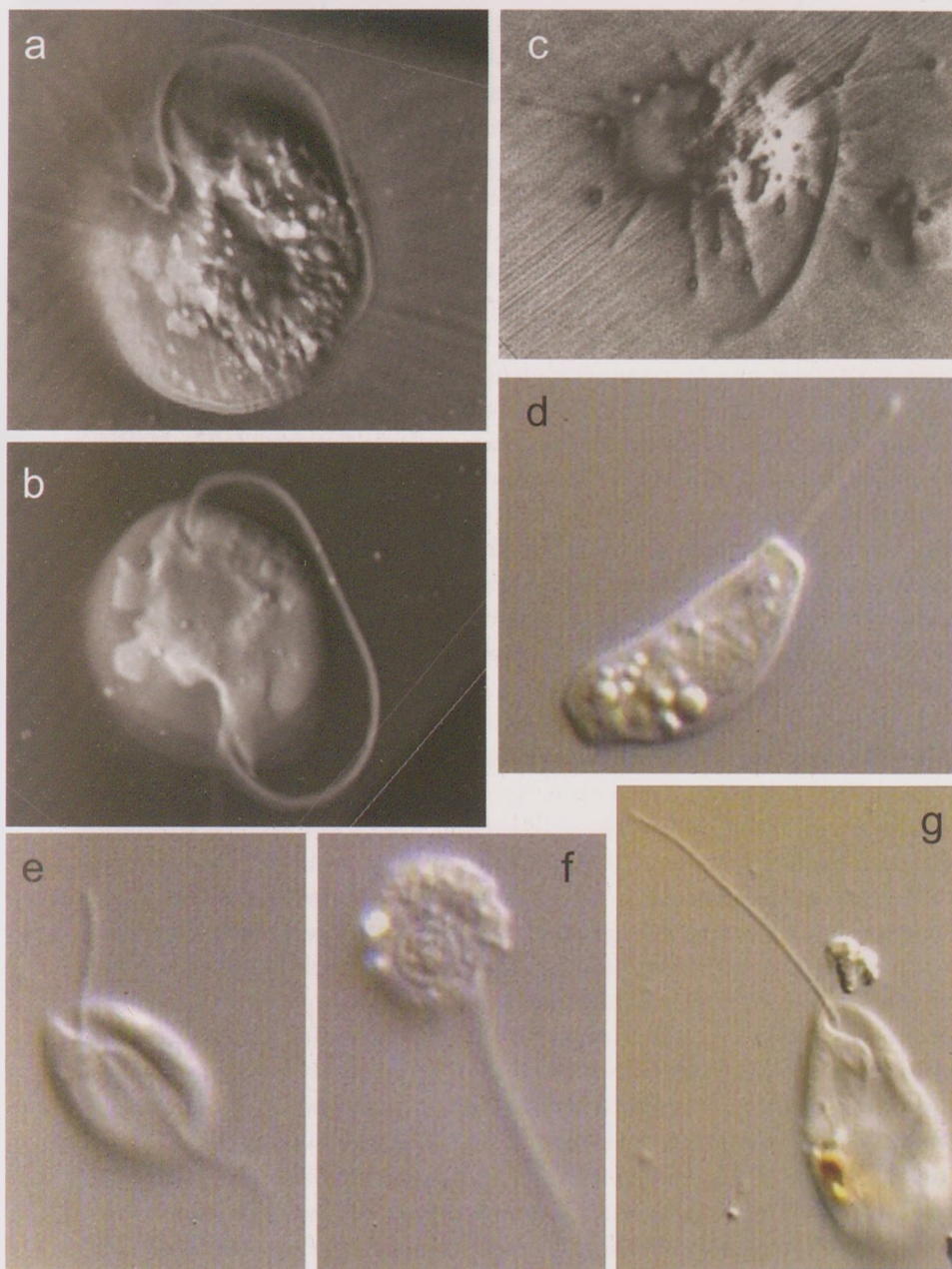
A módszer ismertetése

A módszert kisméretű eukarióta egysejtűek (elsősorban heterotróf ostorosok) vizsgálata során dolgoztuk ki. Nagyfelbontású fordított mikroszkópot használtunk (Olympus IX-70), melynél az objektív a fedőlemez alatt van, ezáltal a fedőlemezre tapadó szervezetek is jól vizsgálhatók. Az egysejtűeket tartalmazó vízmintát a fedőlemezre csöpögtettük, ráhelyeztünk egy fedőlemeznel kisebb, középen lyukas műanyag lemezt, és a kondenzorlencsét a lyuknál közvetlenül belenyomtuk a vízmintába. A fedőlemez és a kondenzor közötti vastagabb víztér lehetővé tette, hogy az objektív mozgatása közben ne érje összenyomó erő a mintát. A vizsgálatokhoz nagy felbontóképességű olajimmerziós objektívet (numerikus apertúra: 1,3), standard áteső Köhler-megvilágítást, a kontrasztosításhoz pedig erős, sötétlátótérhez közeli Nomarski differenciál interferenciakontraszt (DIC) optikát alkalmaztunk.

A szervezetekről videofelvételeket készítettünk egy analóg videokamera (JVC-KYF30B 3CCD) segítségével. A videojelet analóg / digitális konverterrel digitalizáltuk, a felvételt pedig tömörítés nélkül számítógép merevlemezre rögzítettük. A videofelvételeket utólag, gyakran képkockáról képkockára léptetve vizsgáltuk, illetve képkockákat vágtunk ki további képelemzés céljára. Az alkalmazott folyamat során fizikai kontrasztosítás történt a DIC használatával, többlet digitális kontrasztosítás pedig a digitalizálás során, a videofelvételek lejátszásakor és a képelemzés (differenciális kontrasztosítás) során. Zajszűrés pedig a digitalizáláskor (4D) és a képelemzés során (szigma és rang) történt. A háromdimenziós rekonstrukcióhoz az optikai szeleteket a nagy apertúrájú objektív kis mélységélessége biztosította, a szervezetek végigszeletelése pedig videofelvétel közben a mikrocsovar mozgatásával történt. Így egy egysejtű szervezetről egyetlen másodperc alatt 25 optikai szelet készíthető. A videóból kivágott szeletekből a Zeiss AxioVision programjának segítségével készítettünk háromdimenziós rekonstrukciót.

Alkalmazási területek

Az eddigi gyakorlat a háromdimenziós szerkezetrekonstrukciókhoz fluoreszcensen festett mintákat használt, amikben a megfestett sejtek / sejtservecskék fluoreszcens fénylése jelenti a rekonstrukcióhoz szükséges specifikus információt. A fent ismertetett áteső megvilágítással és DIC kontrasztosítással készült képeken a szürke háttéren megjelenő finom intenzitáskülönbségek hordozzák az információt. Ennek ellenére az erőteljes kontrasztosítás és a képelemzés során használt további differenciális kontrasztosítás



34. ábra. Nem leírt ostoros fajokról készített térbeli rekonstrukciók és képek. a-b: *Protaspis* sp. térbeli rekonstrukciója. a: A sejt bal felső oldalán látható a két ostor eredése a két alapi testtel. b: Az állábszerkezet rekonstrukciója. c: *Cercomonas* sp. fonalas állásbas amöboid formája, a vékony állábakban látszanak az extruszómák, az ostor jobb oldalon lefelé ível. d-g: Videofelvételekből kivágott képek. d: *Petalomonas* sp., e: *Protaspis* sp., f: *Metromonas* sp., g: *Notosolenus* sp. (Képek: Kiss Áron Keve)

lehetővé tette a térbeli rekonstrukciót. A térbeli képen a fluoreszcens módszerekkel szemben minden, áteső megvilágítással látható sejtalkotó megtalálható. A módszer így részletes általános képet ad a sejtről, bizonyos struktúrák azonban specifikus jelölés nélkül csak kevésbé vagy egyáltalán nem láthatók. Heterotróf ostorosoknál a sejt felszíne, a sejtmag szerkezete, az ostorok eredése, az alapi testek, mikrotubuluskötegek, a sejtplazmában található részecskék, a Golgi készülék, az állábak térbeli alakja, a bekebelező szervecske, stb. megjeleníthető térben. Kisebb nagyítású objektívekkel vizsgálható a kisméretű többsejtű élő állatok testszerkezete, a gyakran visszahúzódó testrészek (pl. kerékszerv) felépítése, a rágó szerkezete az élő állatban és sok más szervecske is.

A kontrasztosított, tömörítetlen videofelvételek képkockáról képkockára való léptetésével számos mozgásforma létrejöttének szerkezeti háttere, és az élőlény szempontjából adaptív funkcionális jelentősége is vizsgálható. Heterotróf ostorosoknál az úzás, ostorcsapás, állábképzés, citoplazma mozgások, életforma váltás, táplálékszerzés megfigyelhetővé válik. Többsejtűeknél szintén jól vizsgálhatóak a különböző táplálékszerzési és menekülési mozgásformák, valamint ezek szerepe a szervezet életében. Megfigyelhető a táplálék elfogyasztás előtt, ezáltal vizsgálható a szilárd vázzal nem rendelkező táplálék mennyiségi és minőségi összetétele is. Mivel a térbeli rekonstrukcióhoz az optikai szeletek nagyon rövid idő alatt (1-2 sec) felvehetőek, lassabb folyamatoknál (pl. állábképzés, bekebelezés, lassabb sejtmozgások) lehetőség van a folyamat során többszöri szerkezetrekonstrukcióra, így tér és időbeli (4D) rekonstrukcióra is.

A módszer segítségével elért eddigi eredmények

A módszer használatával jelentős eredményeket értünk el a heterotróf ostorosok helyi diverzitásának (Kiss és mtsai 2008, 2009a, b) és funkcionális sokféleségének vizsgálata során (Kiss 2008). Egyetlen dunai planktonmintából származó természetközeli, dúsításmentes tenyészet részletes vizsgálata során 130 heterotróf ostorost, illetve összesen 183 kisméretű (30 μm alatti) heterotróf eukarióta fajt mutattunk ki. A talált fajok legnagyobb része nagyon kis egyedszámban került elő (gyakran csak egyetlen példány), a ritka fajok száma nagyon nagy. A talált fajok 44%-a (55 faj) ismereteink szerint nem leírt, a tudományra nézve új. Ez az óriási heterotróf egysejtű diverzitás lényegesen meghaladja az eddigi mikroszkópos vizsgálatok során kimutatott fajszerkezeteket. A talált nagyon nagy számú ritka faj egybeesik az eddig csak molekuláris ökológiai vizsgálatok során kimutatott 'ritka egysejtű bioszféra' koncepcióval (STOECK és mtsai 2009). A különböző funkcionális jellemzők vizsgálatával az eddig többnyire egységesen baktériumfogyasztóknak tekintett heterotróf ostorosok között meglehetősen nagy funkcionális sokféleséget (15 különböző niche csoport) tártunk fel. Eredményeinkhez nagyban hozzájárult a fent ismertetett videomikrográfias módszer használata. Lehetőségünk nyílt minden ritka fajról videofelvételt készíteni, a felvételeket később elemezni tudtuk, a sejtek térbeli szerkezetét rekonstruáltuk, és a legkisebb, fénymikroszkóppal még látható sejtszerkezeti

bélyegeket is fel tudtuk használni a meghatározásban. A nagy funkcionális sokféleség vizsgálata során a videofelvételek alkalmazásával természetes körülmények között tudtuk vizsgálni a fajok táplálékkeresési, táplálkozási, predátor elkerülő, életforma-váltási és egyéb jellemzőiket, így számos különböző realizált niche-t tudtunk feltárni.

Kitekintés – a továbbfejlesztés lehetőségei

A jelen cikkben ismertetett módszer több különböző irányban is továbbfejleszthető. A fénymikroszkóp felbontóképessége tovább növelhető speciális, még nagyobb apertúrájú objektívek használatával (TIRF objektívek), a megvilágító hullámhossz csökkentésével (kék ill. közeli UV) és részben ferde megvilágítással. A kontraszt (különböző fénytörésű sejtstruktúrák megjelenítése) növelhető a DIC-kel összehangolt irányú ferde megvilágítással, az analóg jel kontrasztosításával, ill. további zajsűrűsítéssel. Az optikai szeletek vastagsága csökkenthető konfokális feltét alkalmazásával és egy matematikai eljárással (dekonvolúció). Nagyon izgalmas és kevésbé kidolgozott terület az élő sejtekben használható (vitális) fluoreszcens festékek alkalmazása mozgó élőlényeknél – ezekkel a festékekkel bizonyos sejtstruktúrák specifikusan jelölhetők és mozgás közben vizsgálhatók (pl. mikrotubulusok, endoplazmatikus retikulum, mitokondriumok). A diverzitásvizsgálatokban a ritka fajok is leszámazástaniilag azonosíthatók volnának, ha sikerülne egy vagy néhány sejtet a mintából kiemelve bizonyos géneket felszaporítani, és bázissorrendjüket meghatározni.

A legfontosabb üzenet az eukarióta mikroorganizmusokkal foglalkozó ökológusok számára talán az, hogy az élő szervezetek megfigyelése, bár manapság nem számít túl divatosnak, rengeteg olyan ökológiaiailag releváns, és gyakran csak így megfigyelhető jelenségre világít rá, melyek feltételezések helyett közvetlen bizonyítékokkal segítenek jobban megérteni az élőlények funkcionális jellemzőit és természetben betöltött szerepüket. Ehhez nyújtanak a modern fénymikroszkópos technikák, köztük az általunk kifejlesztett módszer is, megfelelő eszközt.

Irodalom

- KISS Á. K. 2008: A dunai heterotróf ostoros közösség táplálkozási stratégiái: funkcionális diverzitás és niche szegregáció. *Hidrológiai Közlemény* 88: 87-90.
- KISS Á. K., ÁCS É., BOLLA B., TÓTH A., TÓTH B., KISS K. T. 2008: Diversity of eukaryotic microorganisms (algae, protozoa, rotifers and microcrustacea) in the River Danube at Göd (Hungary). *Proceedings of the 37th International Conference of IAD*, Chisinau, Moldova. *Limnological Reports* 37: 170-175.
- KISS Á. K., ÁCS É., KISS K. T. 2009a: The unexpected local diversity of heterotrophic flagellates and other nanoeukaryotes in the River Danube – a huge diversity of rare species is explored. *Proceedings XIII. International Congress of Protistology*, p. 220.

- KISS Á. K., ÁCS É., KISS K. T. 2009b: Váratlan heterotróf nanoeukaróta diverzitás a Duna planktonjában. *Hidrológiai Közlöny* 87/6 (elfogadva)
- STOECK T., RICHARDS T. A., BASS D., NEBEL M., 2009: Exploring the "Rare Protistan Biosphere". 28. Wissenschaftliche Tagung der Deutsche Gesellschaft für Protozoologie, Naumburg (Saale). Programm & Abstracts, Universität Leipzig p. 29.