

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ВАКУОЛЯРНОЙ МЕМБРАНЫ С ПОМОЩЬЮ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В.Н. Нурминский, И.С. Нестеркина, Н.В. Озолина
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: cell@sifibr.irk.ru

Атомно-силовая микроскопия (АСМ) – одна из разновидностей сканирующей зондовой микроскопии (Binning et al., 1986). АСМ широко применяется в исследованиях по физике, химии, материаловедению, а также в биологии и медицине (Lu et al., 2005; Müller and Dufrêne, 2011). Первоначально биологические образцы для АСМ подвергали высушиванию на воздухе. Однако воздушная сушка сильно влияет на морфологию образцов, и полученные таким образом образцы теряют свою нативность (Butt et al., 1990). Хорошо исследовано влияние химической фиксации на клетки и ткани, и, как известно, биологические образцы также теряют нативность после химической обработки (Nowakowski et al., 2001). В последнее время активно исследуют биологические мембраны, живые клетки и ткани, и происходящие в них процессы *in vivo* с помощью АСМ. Этот метод не только выявляет топографию поверхности биологических образцов в физиологических условиях, но также обеспечивает изучение микромеханических свойств с высоким разрешением (Radmacher, 2002; Matzke et al., 2001).

Биологические мембраны – тонкие (не более 10 нм толщиной) липопротеидные пленки, состоящие из двойного слоя липидных молекул, в который включены молекулы разнообразных белков. Плоские по своей структуре мембраны, заполненные белками, выступающими всего на несколько нм над поверхностью, вполне пригодны для высокоуровневой визуализации с помощью АСМ (Frederix et al., 2009).

Одной из принципиальных особенностей растительной клетки является наличие в ней центральной вакуоли, которая в зрелом состоянии может занимать большую часть объема клетки. Основные функции вакуоли заключаются в участии в процессах ионного гомеостаза цитозоля, запасаения первичных и вторичных метаболитов, осмотической регуляции, детоксикации ксенобиотиков, формирования защитных ответных реакций клеток, например, метаболических реакций на токсины, и в процессах запрограммированной клеточной смерти (Андреев, 2001, 2012).

Вакуоль растительной клетки представляет собой активно функционирующую органеллу, способную к динамичным морфологическим перестройкам. Вакуолярная система растительной клетки отличается сложной пространственной структурой. Регистрировали инвагинации вакуолярной мембраны, сопровождающиеся отделением везикул (Sheahan et al., 2007; Assani et al., 2009). Установлено, что через вакуоль проходят многочисленные цитоплазматические тяжи, соединенные с вакуолярной мембраной и ограниченные мембраной (Нурминский и др., 2012). Прослеживается связь вакуоли с элементами цитоскелета (Sheahan et al., 2007; Gao et al., 2009), а именно с актиновыми микрофиламентами (Sheahan et al., 2007).

Ранее было показано, что вакуолярная мембрана характеризуется высокой упорядоченностью липидов, присутствующих в ней в виде участков свободного жидкого липидного бислоя и участков, связанных с мембранными белками. Известно, что в вакуолярной мембране преобладают полярные липиды с высоким содержанием ненасыщенных жирнокислотных остатков. Преобладание таких липидов придает мембране высокую эластичность и пониженную микровязкость (Макаренко, Салаяев, 1998). Сравнительно недавно в вакуолярной мембране были обнаружены липидные домены (рафты), обладающие более плотной упаковкой липидов, по сравнению с остальной частью мембраны (Ozolina et al., 2013). Однако детали ультраструктуры вакуолярной мембра-

ны и ее роль в адаптации к стрессовым воздействиям остаются исследованными недостаточно.

В настоящей работе проведено исследование вакуолярной мембраны корнеплодов столовой свеклы с помощью АСМ: подобраны условия для приготовления высушенных препаратов мембран изолированных вакуолей и получены изображения поверхности вакуолярных мембран (рис. 1–3).

Рис. 1. Визуализация структуры мембран изолированных вакуолей с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ), 3D-изображение.

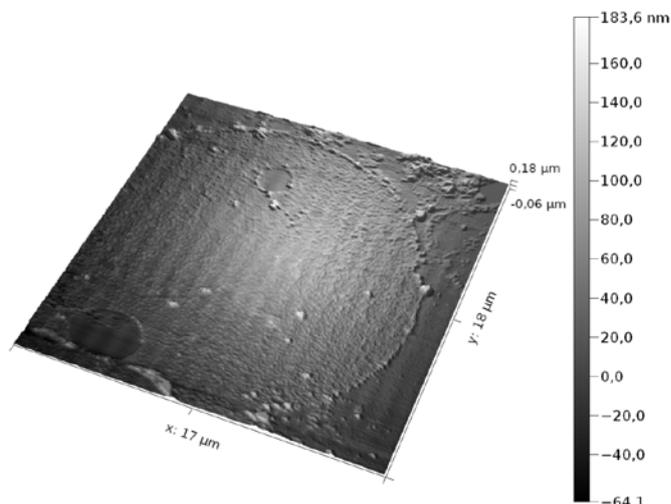


Рис. 2. Поверхность мембраны высушенного образца изолированной вакуоли.

3D-изображение, полученное с помощью АСМ. Бугорки на поверхности мембраны (стрелка).

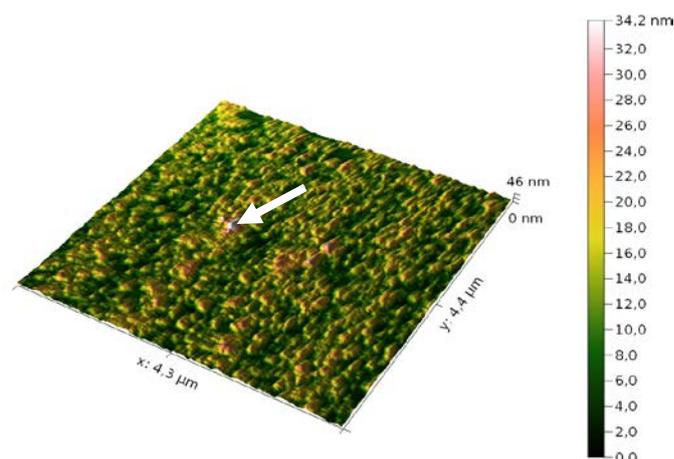
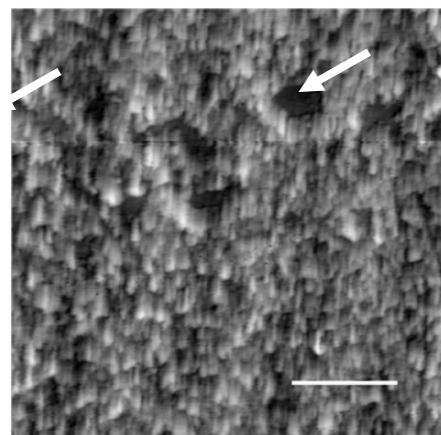


Рис. 3. Рельеф поверхности мембраны высушенного образца изолированной вакуоли.

Неспецифические стрессовые поры в мембране (стрелка). Масштабный отрезок – 3 мкм.



Выявлена неоднородность рельефа поверхности мембраны. Предполагается, что мелкие (порядка 30–40 нм в диаметре) бугорки (возвышенности) на поверхности мембраны могут представлять более плотноупакованные рафтовые структуры тонопласта (рис. 2). Выявлены также углубления в рельефе поверхности мембраны, в виде неспецифических стрессовых пор диаметром 1–2 мкм (рис. 3).

Литература

- Андреев И.М. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток // Физиология растений. – 2012. – Т. 59 (5). – С. 660–667.
- Андреев И.М. Функции вакуоли в клетках высших растений // Физиология растений. – 2001. – Т. 48 (5). – С. 777–787.
- Макаренко С.П., Саляев Р.К. Структура вакуолярных мембран растений по данным ИК-спектроскопии // Биол. мембраны. – 1998. – Т. 15 (3). – С. 309–321.
- Assani A., Moundanga S., Beney L., Gervais P. Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration // Ann. Bot. – 2009. – V. 104. – P. 1389–1395.
- Binning G., Quate C.F., Gerber C. Atomic force microscopy // Physical Review Letters. – 1986. – V. 56. – P. 930–933.
- Butt H.J., Wolff E.K., Gould S.A.C., Dixon Northern B., Peterson C.M., Hansma P.K. Imaging cells with the atomic force microscope // J Struct Biol. – 1990. – V. 105. – P. 54–61.
- Frederix P.L.T.M., Bosshart P.D., Engel A. Atomic force microscopy of biological membranes // Biophys J. – 2009. – V. 96 (2). – P. 329–338.
- Gao X.Q., Wang X.L., Ren F., Chen J., Wang X.C. Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement // Plant Cell Environ. – 2009. – V. 32. – P. 1108–1116.
- Lu Z.X., Zhang Z.L., Pang D.W. Atomic force microscopy in cell biology // Chinese Science Bulletin. – 2005. – V. 50. – P. 1409–1414.
- Matzke R., Jacobson K., Radmacher M. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells // Nat Cell Biol. – 2001. – V. 3. – P. 607–610.
- Müller D.J., Dufrêne Y.F. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface // Trends Cell Biol. – 2011. – 21 (8). – P. 461–469.
- Nowakowski R., Luckham P., Winlove P. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy // BBA-Biomembranes. – 2001. – V. 1514. – P. 170–176.
- Ozolina N.V., Nesterkina I.S., Kolesnikova E.V., Salyaev R.K., Nurminsky V.N., Rakevich A.L., Martynovich E.F., Chernyshov M.Yu. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains // Planta. – 2013. – V. 237. – P. 859–871.
- Radmacher M. Measuring the elastic properties of living cells by the atomic force microscope // Methods Cell Biol. – 2002. – V. 68. – P. 67–90.
- Sheahan M.B., Rose R.J., McCurdy D.W. Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts // Protoplasma. – 2007. – V. 230. – P. 141–152.