

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОРГАНЕЛЛ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

А.В. Степанов

ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: stepanov@sifibr.irk.ru

Методы флуоресцентной микроскопии получают всё большее распространение для оценки различных физиологических параметров и определённых локальных внутриклеточных событий, происходящих в живой клетке в норме и при различных патологических состояниях или неблагоприятных условиях. Большинство растений, как и животных, состоит из более чем одного слоя клеток и, таким образом, не являются идеальным объектом для световой микроскопии вообще, и в частности, для флуоресцентной микроскопии. Кроме того, каждая клетка окружена жёсткой клеточной стенкой и имеет большую центральную вакуоль. Вся совокупность протопласта со всеми присутствующими ему органеллами составляет лишь небольшую пристеночную область, находящуюся, к тому же, в постоянном движении. Всё это вместе затрудняет наблюдение процессов происходящих внутри клеток *in vivo*. Особенно это связано с наблюдением за функционированием органелл.

В целом, использование флуоресцентных методов в физиологии растений связано с двумя проблемами: прохождением возбуждающего и испускаемого красителями света (либо его размыванием) и поступлением в клетку самих красителей. Первую проблему можно решить либо получением оптических срезов (с использованием специальной дорогостоящей аппаратуры), либо биотехнологически – получением суспензионной культуры клеток. Вторая проблема решается только ферментативным удалением клеточной стенки – протопластированием.

Целью данной работы явилось обобщение более чем десятилетнего опыта работы в области флуоресцентной микроскопии для изучения органелл растительных клеток, большей частью митохондрий.

Современная химическая промышленность предоставляет широкий спектр специфических красителей, достаточный для селективного окрашивания практически любого клеточного компартмента, молекулы, либо физиологического параметра. Однако только малая их часть подходит для прижизненного исследования клеток. Так как не все из них имеют подходящие размеры и заряд для прохождения через плазмалемму, и ещё меньше – способны оставаться долгое время внутри, осуществлять свои специфические функции, не причиняя при этом особого вреда клетке. Следует также помнить, что разрабатываются все эти красители и проходят апробацию в основном на животных клетках, которые не имеют клеточной стенки и вакуоли и являются гораздо более благодарными объектами, чем растения и микроорганизмы. Часто приобретённые красители оказываются не способными проникать через клеточную стенку, либо сорбируются на ней, экранируя и маскируя внутренние целевые структуры. Использование метода протопластирования часто успешно решает эти проблемы. Клеточная стенка ферментативно растворяется, а использование гипертоничных растворов для поддержания целостности протопластов уменьшает отношение вакуоли к протоплазме, что также благотворно сказывается на процессе микроскопирования, однако само помещение клеток в гипертоничный раствор является определённым стрессом для них.

Следующим подводным камнем при использовании флуоресцентных зондов в частности для изучения стресс-адаптации является то, что производитель гарантирует адекватную работу красителя только в физиологически нормальных условиях. Если применяемое воздействие коренным образом нарушает работу клетки – как поведёт се-

бя краситель при этом, никто не знает. И вам потребуется проведение дополнительных контролей адекватности работы красителей.

По нашим данным, использование флуоресцентных зондов без контролей специфичности их работы не допустимо. Так, например, митохондриальные красители работают по принципу максимального отрицательного заряда, так как в физиологически нормальных условиях он там максимален. Однако при отсутствии большой разницы эти красители хорошо красят и другие компартменты и соединения, обладающие отрицательным зарядом, например липидные капли, масла, другие мембраны, клеточные стенки.

Большинство витальных красок не фиксирбельны, то есть исследования можно проводить только в момент воздействия или прохождения нужного процесса, что также создаёт определённые неудобства. Существует ряд фиксирбельных красителей, например, на митохондрии, которые действуют как градусник. Однако эти красители следует использовать ещё более осторожно. При сопоставлении сигналов из живых и фиксированных клеток, интенсивность флуоресценции на порядок снижается, и форма митохондрий заметно изменяется. Здесь нужно тщательно подбирать способ фиксации, чтобы артефакты были минимальными.

У нативных фотосинтезирующих клеток растений около 80 % объёма занимают хлоропласты, что затрудняет изучение других компартментов клеток (например, митохондрий). В этом случае удобнее использовать гетеротрофные темновые суспензионные культуры клеток, а уже потом ключевые моменты подтверждать на суспензионных культурах клеток, выращенных на свету, или протопластах, полученных из зеленых листьев.

По сравнению с отдельными растениями и проростками суспензионные культуры клеток представляют стабильный, однородный в генетическом отношении материал, который можно нарабатывать регулярно и в любых объёмах.

Таким образом, изучение физиологии органелл растительных клеток методом флуоресцентной микроскопии не такое простое занятие и использование гетеротрофных суспензионных культур и протопластов существенно помогает в этом процессе.