

1.2.2. КЛЕТКИ РАСТЕНИЙ

Часто в качестве объекта электробиологических исследований используются водоросли семейства харовых. Они удобны для микроэлектродного изучения благодаря крупным размерам. Длина одной клетки достигает 40 мкм, а диаметр составляет от 150 до 500 мкм (рис. 1.2). Снаружи клетка покрыта клеточной оболочкой толщиной до 15 мкм, далее следует клеточная мембрана — плазмолемма, толщина которой составляет от 10 до 15 нм, между вакуолью и плазмолеммой находится слой цитоплазмы (от 15 до 25 мкм), содержащий хлоропласты.

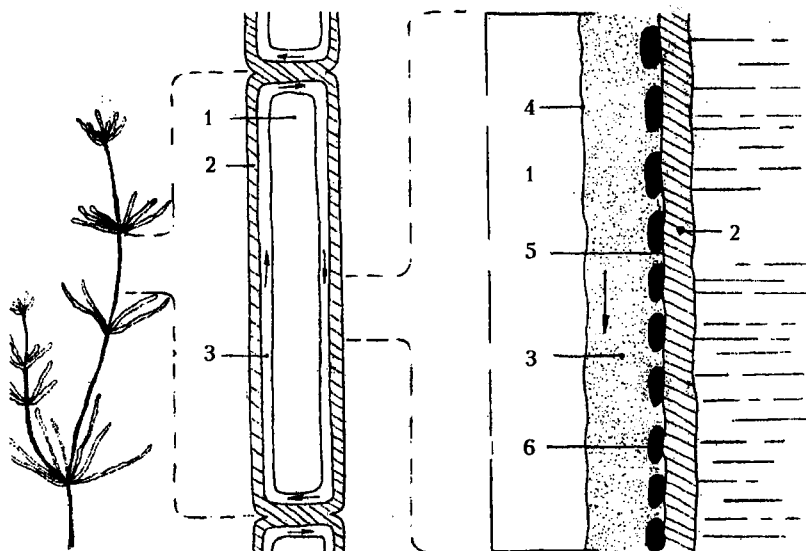


Рис. 1.2. Общий вид и строение водоросли *Nitella*: 1 — вакуоль; 2 — клеточная стенка; 3 — цитоплазма; 4 — тонопласт; 5 — плазмолемма; 6 — хлоропласт

1.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КЛЕТОК

1.3.1. МЕТОД ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Одним из традиционных методов клеточной биофизики наряду со световой (оптической) микроскопией является метод электронной микроскопии, который позволяет наблюдать объекты размером меньше 10 нм (рис. 1.3). При использовании данного метода клетки и ткани фиксируют в 2,5%-м растворе глутарового альдегида, приготовленного

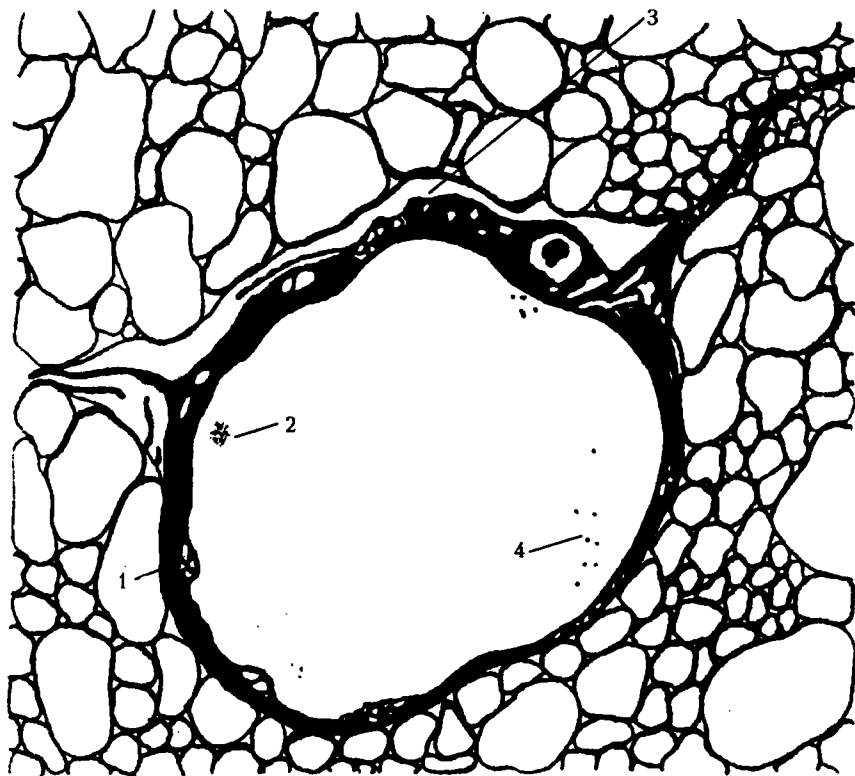


Рис. 1.3. Электронная фотография гигантского аксона кальмара:
 1 — аксолема; 2 — митохондрия; 3 — шванновская клетка;
 4 — нейрофилламенты

на 0,1 М фосфатном или Na-какодилатном буфере (рН 7,2 — 7,4). Затем для удаления глутарового альдегида препараты промывают буферным раствором и окрашивают 1%-м раствором OsO_4 . Далее препараты обрабатывают спиртовыми растворами возрастающей концентрации (от 30 до 100°). Для повышения контрастности окрашенных препаратов к 70-градусному спирту добавляют 2%-й раствор уранил-ацетата. Обезвоживание осуществляют путем выдерживания препаратов в абсолютном ацетоне при периодической смене раствора. Для заливки образцов готовят смесь ацетон — смола в соотношении 3 : 1. В состав смолы входит ряд специальных ингредиентов. После заливки срезы помещают в термостат и инкубируют при температуре 37 °С в течение 12 ч. После удаления ацетона препарат заливают смолой и последовательно инкубируют при температуре от 37 до 57 °С. Далее препараты нарезают на микротоме (срезы толщиной 60 — 90 нм),

просматривают и фотографируют в электронном микроскопе ЭЛМ-100А.

1.3.2. МЕТОД ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Для регистрации изменений многих клеточных процессов и характеристики вязкости, мембранного потенциала, внутриклеточного или связанного содержания ионов используют метод флуоресцентных зондов (например, такие зонды, как fura-2, хлортетрациклин, 9-аминоакридин и флуоресцеиндиацетат).

В основе метода флуоресцентного определения мембраносвязанного кальция лежит способность антибиотика ХТЦ, локализованного в мембране, образовывать комплекс с ионом кальция, что приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции зонда. Его свечение регистрируют с одного и того же участка клетки в течение всего времени эксперимента с помощью люминесцентного микроскопа. Возбуждение флуоресценции ХТЦ вызывают с помощью галогенной лампы накаливания, выделяя полосу за счет комбинации фильтров. Регистрацию свечения проводят с помощью фотометрической насадки, выделяя полосу с помощью интерференционных светофильтров при длине волны максимального пропускания светового пучка 490 и 550 нм.

При регистрации внутриклеточного рН в качестве зонда используют ФДА в конечной концентрации 10^{-5} моль. После 20 мин инкубации (время, необходимое для накопления в объекте достаточного для флуориметрии количества флуоресцеина) клетки тщательно отмывают от экстраклеточного ФДА. Для обеспечения постоянного рН экстраклеточной среды при инкубации клеток добавляют 50 ммоль НЕРЕС, доводя рН раствора до 6,2 — 8,5. Спектры флуоресценции препаратов регистрируют с помощью инвертированного микроспектрофлуориметра: возбуждение флуоресценции препаратов осуществляют обычно с помощью галогенной лампы накаливания и комбинации стеклянных светофильтров. Размер фотометрируемого участка клетки составляет, как правило, 60 × 60 мкм (при объективе × 10). Значение внутриклеточного рН определяют по величине отношения интенсивностей флуоресценции окрашенного препарата при длинах волн 516 и 570 нм, сопоставляя его со значениями соответствующей калибровочной кривой, представляющей собой зависимость величины этого отношения от значений рН буферных растворов флуоресцеина.

Для регистрации внутриклеточного Ca^{2+} после загрузки и перед началом опыта клетки промывают исходным раствором и выдерживают 30 — 40 мин для дезтерифицирования и достижения равновесного распределения между связанной и свободной формами молекул зонда (fura-2) внутри клетки. Для определения содержания кальция в клетке применяют микроспектрофлуориметрический метод. Клетки помещают в перфузируемую ячейку на предметном столике инвертиро-

ванного микроскопа, совмещенного со спектрофлуориметром, оснащенным ксеноновой лампой, разделителем лучей, двумя монохроматорами и двойным зеркальным чопперным механизмом, позволяющим чередовать возбуждение молекул fura-2 лучами двух длин волн — 340 и 380 нм (с частотой 100 Гц). Ширина полосы возбуждения не должна превышать 3,5 нм. Концентрацию Ca^{2+} рассчитывают по отношению интенсивностей флуоресценции (505 нм) в ответ на возбуждение, вызванное лучами с длинами волн 340 и 380 нм.

1.3.3. МЕТОД ВОССТАНОВЛЕННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПОСЛЕ ФОТООТБЕЛИВАНИЯ

Метод восстановленной флуоресценции после фотоотбеливания используется в биофизике клетки для измерения коэффициента латеральной диффузии белков и липидов в плазматических мембранах. Если пометить интересующие нас белки или фосфолипиды флуоресцентной меткой, например производным флуоресцеина, и ввести их в клетку, то при регистрации с помощью флуоресцентного микроскопа (рис. 1.4) наблюдается флуоресценция, величину которой можно оценить фотоэлектронным умножителем и проанализировать на персональном компьютере.

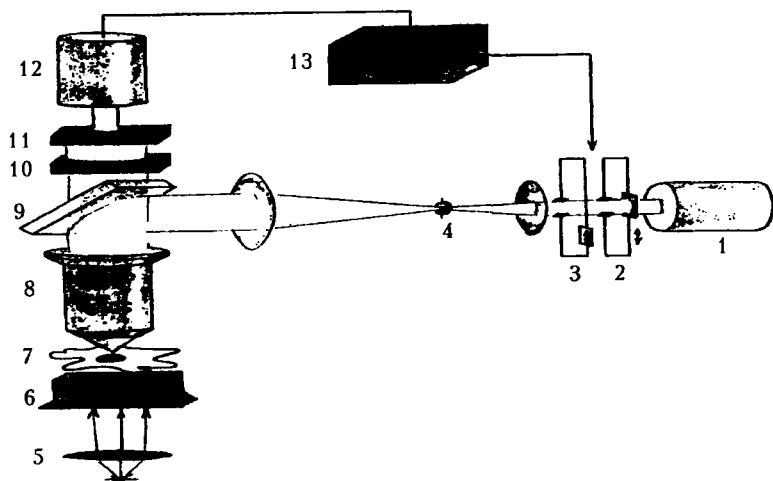


Рис. 1.4. Упрощенная схема установки для исследования восстановленной флуоресценции после фотоотбеливания: 1 — лазер; 2, 3 — аттенюаторы (ослабители луча); 4 — диафрагма; 5 — осветитель; 6 — конденсатор микроскопа; 7 — исследуемая клетка; 8 — объектив микроскопа; 9 — дихроичное зеркало, отражающее падающий свет и пропускающее свет возбужденной флуоресценции; 10 — отсекающий светофильтр; 11 — «зонд» — узкая диафрагма, выделяющая флуоресценцию с исследуемого участка; 12 — ФЭУ; 13 — блок регистрации и управления установкой

Возбуждающий флуоресценцию луч лазера фокусируется на участке плазматической мембраны (порядка нескольких квадратных микрон). Далее этот луч должен быть ослаблен аттенюаторами настолько, чтобы вызвать лишь флуоресценцию метки, но не фотоокисление компонентов мембраны (рис. 1.5).

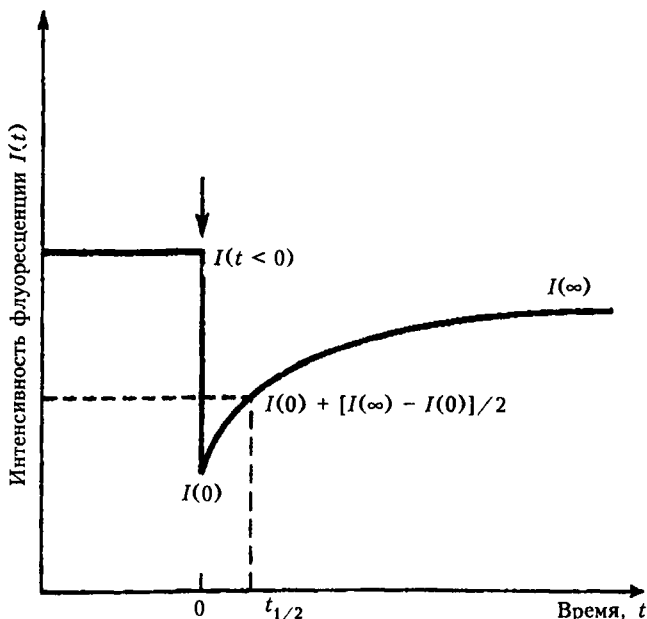


Рис. 1.5. Восстановление интенсивности флуоресценции после фотоотбеливания. Метод расчета данных по трем точкам: $I(t < 0)$ — интенсивность флуоресценции до фотоотбеливания; $I(0)$ — интенсивность флуоресценции непосредственно после фотоотбеливания; $I(\infty)$ — предельное значение интенсивности флуоресценции после ее восстановления. Стрелкой отмечен момент фотоотбеливания

В начале эксперимента интенсивность возбуждающего луча на несколько десятков миллисекунд увеличивают настолько, чтобы вызвать фотоокисление флуоресцентной метки (фотоотбеливание). Вслед за этим его интенсивность возвращают к исходному уровню и регистрируют интенсивность флуоресценции участка клетки после фотоокисления метки. Так как продукт фотоокисления не флуоресцирует, то восстановление исходного уровня флуоресценции наступает вследствие латеральной диффузии меченых молекул белка или липида из соседних областей клетки. Таким образом, регистрация скорости восстановления исходного уровня флуоресценции участка мембраны клетки после фотоотбеливания позволяет определить коэффициенты диффузии мембранных белков и липидов.

1.3.4. МЕТОД КОНФОКАЛЬНОЙ ЛАЗЕРНОЙ СКАНИРУЮЩЕЙ МИКРОСКОПИИ

Теория метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии была разработана в 1977 — 1978 гг. Основное условие конфокальности (совпадения фокусов) заключается в том, чтобы проекция диафрагмы детектора на объекте точно совпадала с фокусом освещающего объект света (рис. 1.6).

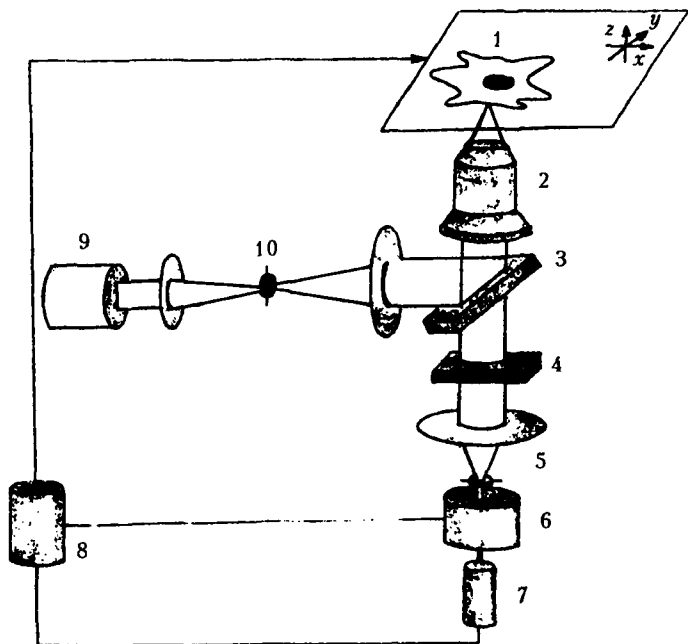


Рис. 1.6. Коифокальный лазерный сканирующий микроскоп: 1 — сканируемый в 3 направлениях предметный столик; 2 — объектив микроскопа (инвертированного); 3 — дихроичное зеркало; 4 — отсекающий фильтр; 5 — диафрагма детектора; 6 — спектрограф (для выделения нужной полосы флуоресценции); 7 — ФЭУ; 8 — блок регистрации и управления установкой; 9 — лазер; 10 — диафрагма осветителя

Существенным моментом регистрации является как можно меньший диаметр диафрагмы детектора, что достижимо при использовании достаточно мощных источников освещения — лазеров. Сочетание этих особенностей позволяет значительно увеличить разрешение (до 100 — 200 нм) и контрастность образца по сравнению с обычной световой микроскопией. Флуоресценция, возникающая в той части образца, на которую сфокусирован объектив, достигает детектора и затем регист-

рируется. В обычной световой люминесцентной микроскопии детектируется флуоресценция всей освещенной части образца, хотя те участки, которые находятся вне фокуса, видны неконтрастно. КЛСМ позволяет послойно просматривать живые клетки (подобие томографии) и количественно оценивать их флуоресцентное изображение. Предметный столик с объектом передвигается в плоскости $x - y$, а также по оси z . Каждое полученное изображение фиксируется компьютером, и даже воссоздается изображение каждого отдельного вертикального оптического среза, что невозможно при обычной оптической световой микроскопии. Количественные характеристики объекта методом КЛСМ получают, определяя интенсивность флуоресценции с помощью ФЭУ. Если исследователя интересует распределение макромолекул данного типа между ядром и цитоплазмой, то «окно» изображения можно поместить в оптический срез ядра, определить интенсивность флуоресценции из него (F_n), а затем поместить такое же «окно» в участок цитоплазмы на том же оптическом срезе и определить интенсивность флуоресценции из этого «окна» (F_c). Тогда отношение $A = F_n / F_c$ будет характеризовать распределение интересующих нас флуоресцентно меченных молекул между ядром и цитоплазмой в данном оптическом срезе.

1.3.5. МЕТОД СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

В настоящее время в биологии широко применяется спектроскопия комбинационного рассеяния. Комбинационное рассеяние света — хорошо известное физическое явление, успешно используемое в исследовании структуры молекулы, ее динамического поведения, внутримолекулярных колебаний и межмолекулярных взаимодействий.

В биологии клетки спектроскопия КР используется при исследовании полимерных биологических макромолекул — полипептидов, полинуклеотидов и полисахаридов. При анализе структуры белков с помощью КР оцениваются полосы спектра, характерные для амида А (колебания N—N-связей), амида 1, амида 2 и амида 3. При анализе структуры нуклеиновых кислот исследуются полосы спектра КР, характерные для воды, сахаров, нуклеотидов (колебания C=O-, C=N- и C=C-связей), симметричные и асимметричные колебания PO₂-связей, колебания PO-связей фосфата и CO-связей сахаров, а также скелетные, деформационные колебания всех связей полинуклеотидов. При анализе структурных изменений полисахаридов с помощью КР-спектроскопии оцениваются колебания OH- и NH-связей сахаров, целлюлозы и хитина (рис. 1.7).

В биофизике клетки КР-спектроскопия широко используется для исследования конформационных изменений белков и фосфолипидов в природных и модельных мембранах. Например, исследование колебаний C—C и C—N-связей позволило выявить зависимости конформа-

ционных изменений углеводородных цепочек жирных кислот от упорядоченности мембранных фосфолипидов клеточной мембраны.

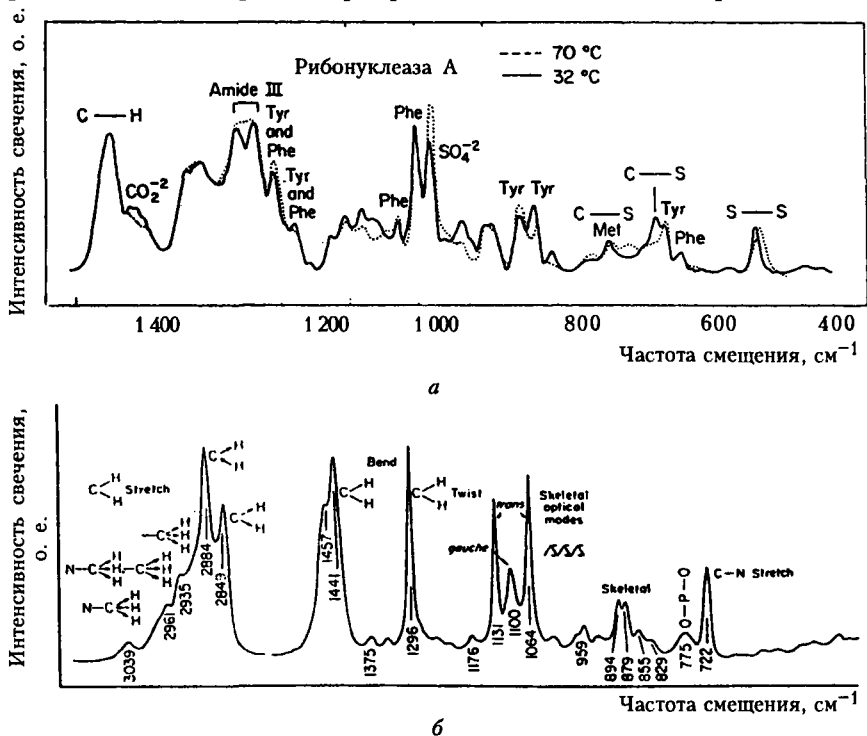


Рис. 1.7. Спектр комбинационного рассеяния белков (а) и липидов (б)

Использование лазерного излучения с длиной волны поглощения порфирина позволяет регистрировать спектры резонансного комбинационного рассеяния протопорфиринов в эритроцитах. В этих спектрах доминируют линии, лежащие в области 1000 – 1650 см^{-1} , которые обусловлены плоскостными колебаниями связей C—C и C—N и деформационными колебаниями C—H. Некоторые из них подвержены влиянию химических превращений, происходящих с атомом железа, и могут быть использованы для изучения структуры макроцикла (рис. 1.8).

При исследовании состояния гемоглобина эритроцитов с помощью КР-спектроскопии образец крови обычно помещают в специальный держатель, что позволяет фокусировать луч возбуждающего света на объекте (рис. 1.9). Источником возбуждающего света при регистрации спектров КР служит газовый лазер, непрерывный генерирующий излучение в области следующих длин волн: 441,6; 476,5; 488,0; 496,5; 501,7; 514,5 нм. С помощью светофильтров мощность излучения под-

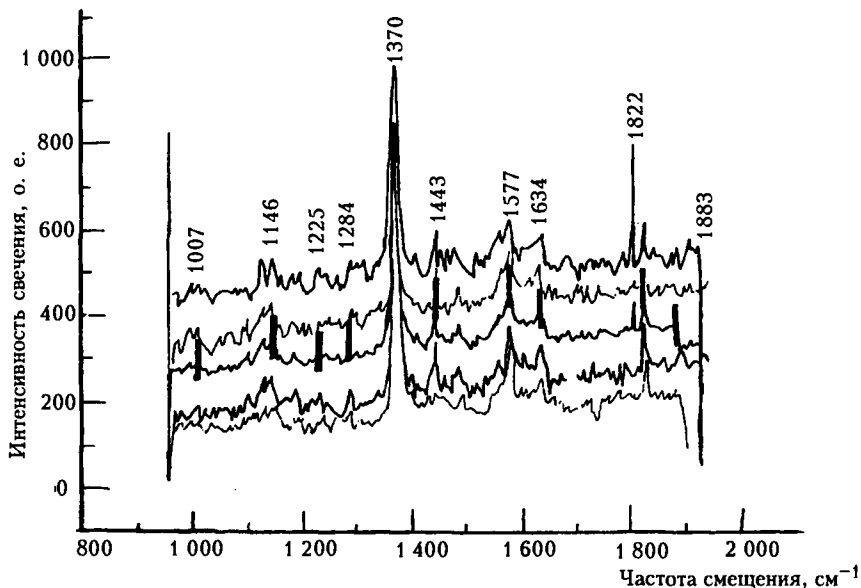


Рис. 1.8. Спектр комбинационного рассеяния порфирина гемоглобина

держивают на уровне 20 – 100 мВт, что не приводит к существенным изменениям нативного состояния объекта. Рассеянное на образце излучение собирают системой линз на входную щель монохроматора. Сканирование спектра КР осуществляют двойным монохроматором,

Лазер Ar+

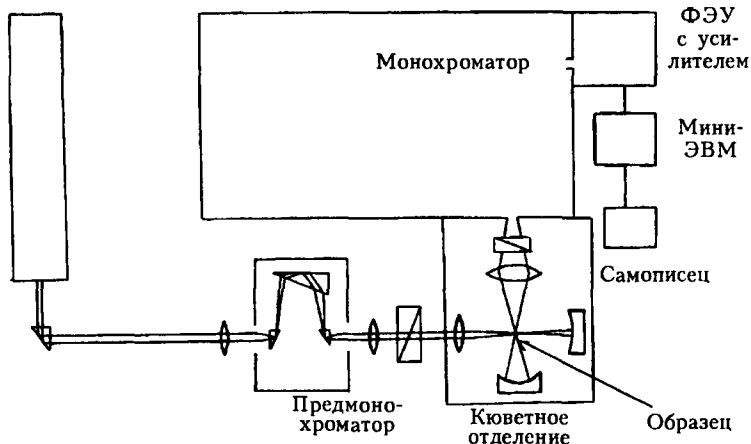


Рис. 1.9. Блок-схема спектрометра комбинационного рассеяния

спектральная область прибора составляет 400 — 850 нм, относительное отверстие — 1 : 5,3, обратная дисперсия — 0,45 нм/мм, полуширина аппаратной функции — не более 1 см⁻¹ (при длине волны 550 нм), скорость сканирования — 0,18 нм/с, точность измерения — около 4 см⁻¹. Регистрацию сигналов РКР осуществляют ФЭУ, работающим в режиме счета фотонов. Накопление спектров проводят на многоканальном анализаторе импульсов или персональном компьютере.

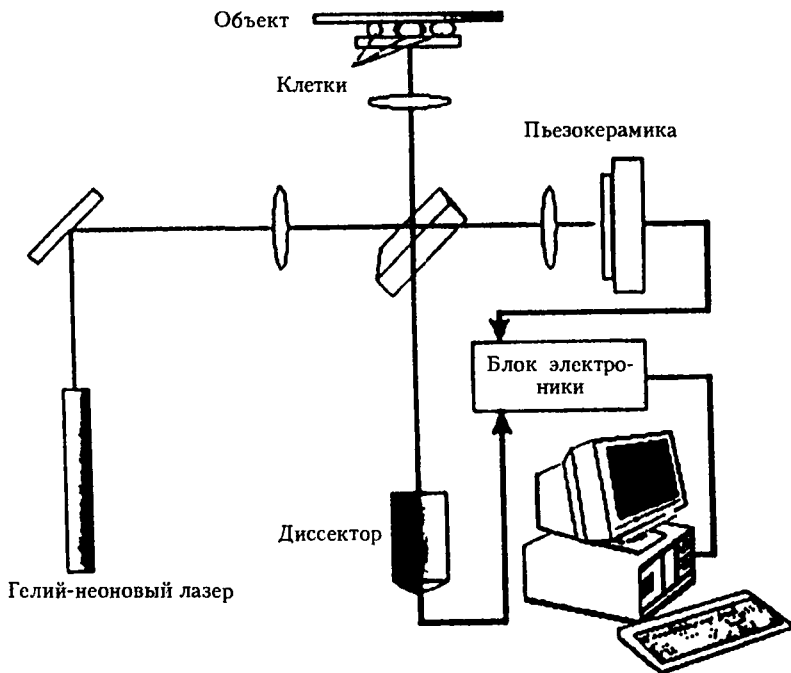
1.3.6. МИКРОСПЕКТРОСКОПИЯ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

Спектры КР от отдельных участков клетки получают на КР-микроспектрометре с тройным монохроматором и фотоэлектронной регистрацией сигнала. Запись и обработку спектров проводят с помощью компьютера. В качестве источника возбуждения используют аргоновый лазер. С целью устранения плазменных линий, расположенных вблизи от возбуждающей линии, перед кюветным отделением помещают предмонохроматор или интерференционный фильтр. Для получения спектров с пространственным разрешением применяют РКР-спектрометр, состыкованный с оптическим микроскопом. При работе с клетками устанавливают водоиммерсионный объектив 100× с числовой апертурой 0,95. Этот объектив фокусирует лазерный луч в плоскости $x - y$ до 1 мкм². Установка диафрагмы диаметром 200 мкм дает пространственное разрешение по оси z , составляющее около 4 мкм. Пространственное разрешение — около 4 мкм³.

1.3.7. МЕТОД ДИНАМИЧЕСКОЙ ФАЗОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В настоящее время для исследования быстрых изменений формы клетки или отдельных ее частей используют лазерный фазовый микроскоп (рис. 1.10), представляющий собой модифицированный интерференционный микроскоп с модуляцией фазы референтной волны, с гелий-неоновым лазером ($\lambda = 633$ нм) для когерентного освещения объекта и диссектором в качестве координатно-чувствительного фотоприемника. Важно, что измерение клеток проводят в отраженном свете. При регистрации используют объектив $\times 20/0,45$, размер поля зрения — 128 × 128 пикс (20 × 20 мкм); время измерения в одной точке скан-линии T_i — 1 мс, время ввода трек-диаграммы — 14,7 с. Микроскоп позволяет получать изображения в виде оцифрованного двумерного распределения фазы $h(x, y)$, которая измерялась в единицах длины (оптической разности хода лучей) в реальном времени. Метод динамической фазовой микроскопии основан на периодических измерениях фазы вдоль произвольно установленного сегмента (скан-линии) в изображении объекта. Полученная при периодическом сканировании матрица чисел (трек-диаграмма) содержит информацию об

изменениях локальной фазовой высоты в точках скан-линии за время измерений. Накопленные в памяти компьютера данные подвергаются обработке и содержат количественную информацию о флуктуациях локальной разности хода (фазовой высоты) $h(x, y)$, пропорциональной проекции локального показателя преломления $n(x, y, z)$. Как правило, линию сканирования выбирают поперек клетки и производят периодические измерения высоты фазового профиля $h(x)$, где x — координата скан-линии.



Р и с. 1.10. Блок-схема динамического фазового микроскопа