

**Московский Государственный Университет
имени М.В. Ломоносова**

Факультет биоинженерии и биоинформатики

Алиева И.Б., Киреев И.И., Курчашова С.Ю., Узбеков Р.Э.

Методы клеточной биологии, используемые в цитогенетике.

*Учебное пособие для проведения практических занятий
по курсу «Цитогенетика»*

МОСКВА - 2010

Учебное пособие для проведения практических занятий по курсу «Цитогенетика» для студентов 3 курса факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Авторы:

Алиева Ирина Борисовна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова.

Киреев Игорь Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова.

Курчашова Светлана Юрьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова.

Узбеков Рустем Эдуардович, доктор биологических наук, ассоциированный профессор факультета биоинженерии и биоинформатики, МГУ им. М. В. Ломоносова.

Под редакцией:

доктора биологических наук **Узбекова Р.Э.**,
доктора биологических наук, профессора **Полякова В.Ю.**

© Алиева И.Б., Киреев И.И., Курчашова С.Ю., Узбеков Р.Э.

Оглавление.

Введение. Место клеточной биологии и ее методических подходов в системе биологических наук -----	2
Глава 1. Методы световой микроскопии -----	3
Глава 2. Культивирование клеток <i>in vitro</i> -----	13
Глава 3. Прижизненное наблюдение клеток -----	33
Глава 4. Гистохимическая окраска препаратов для световой микроскопии ----	46
Глава 5. Иммуноцитохимия -----	56
Глава 6. Флуоресцентная микроскопия -----	72
Глава 7. Электронная микроскопия -----	79
Глава 8. Определение параметров клеточного цикла -----	92
Глава 9. Синхронизация клеток в культуре -----	105
Глава 10. Приготовление хромосомных препаратов и гибридизация <i>in situ</i> ----	114
Глава 11. Выявление активных ядрышковых организаторов -----	121
Глава 12. Трансформация клеток -----	127

Введение.

Несмотря на то, что первые микроскопы были изобретены еще в 17 веке, планомерное изучение клеток и входящих в их состав органелл получило бурное развитие только во второй половине 19 века. Тогда же появилась наука "Цитология", которая является предшественницей современной науки "Клеточная биология". В отличие от классической цитологии, методологически основанной практически исключительно на микроскопическом анализе специально подготовленных для этого клеток, клеточная биология использует более широкий арсенал методов, включая биохимические, молекулярно-биологические и биофизические. Кроме того, в клеточной биологии широко применяются различные методы электронной микроскопии и иммуноцитохимического анализа. Качественный морфологический анализ дополняется количественным анализом различных внутриклеточных процессов и их математическим моделированием.

Основной задачей предлагаемого практического курса является обучение студентов основным методам современной клеточной биологии. В каждом разделе имеется небольшая теоретическая часть, которая знакомит студентов с базовыми сведениями, касающимися выполняемой задачи. В экспериментальной части более детально обсуждаются методические тонкости и сложности, которые могут встретиться в процессе выполнения работы, указываются "Цель работы", "Практическая задача", "Объект исследования", необходимые "Приборы и реактивы" и "Последовательность экспериментальных операций", точно соблюдая которую студент сможет выполнить поставленную задачу. В некоторых главах приведено описание нескольких экспериментальных задач, выбор которых может быть осуществлен в зависимости от возможностей экспериментальной базы. Первая часть практикума (Главы 1-7) знакомит студентов с методами и принципами морфологического анализа. Во второй части представлено несколько задач, в которых уже изученные методы дополняются цитофизиологическими и молекулярно-биологическими методами. В зависимости от учебного плана и времени, отведенного на практикум, часть задач может быть выполнена в демонстрационном режиме, в том числе, на примере реальных научных исследований, проводимых в лаборатории, на базе которой осуществляется выполнение задач практикума.

Глава 1. Методы световой микроскопии.

1. Теоретическая часть.

Устройство микроскопа. Метод светлого поля.

На **Рис. 1** приведена принципиальная схема современного оптического микроскопа. Свет непосредственно от источника (1) и от заднего зеркала осветителя направляется в оптическую систему микроскопа. Линзы коллектора (3) обеспечивают формирование централизованного близкого к параллельному светового пучка. При необходимости для уменьшения интенсивности света или для выделения света определенной длины волны могут быть использованы светофильтры (4). Регулировка интенсивности освещения может также производиться изменением уровня накала лампы осветителя. Конденсор (8) фокусирует свет в плоскости объекта, обеспечивая яркое и равномерное освещение.

Объект (11) располагается на предметном столике (10), который обеспечивает перемещение объекта для фокусировки и исследования различных зон препарата. Перемещение в плоскости XY осуществляется при помощи коаксиальных ручек, расположенных на предметном столике. Перемещение по оси Z осуществляется при помощи вращения ручек фокусировки, расположенных на станине микроскопа (12, 13). Формирование увеличенного изображения происходит при помощи объектива (14), который имеет фиксированное увеличение, поэтому для проведения исследований в широком диапазоне увеличений современные микроскопы снабжены набором объективов, закрепленных на вращающемся револьвере.

Окуляры (16), расположенные на бинокулярной насадке, проецируют увеличенное изображение объекта на сетчатку глаза. Кроме того, часть света (или весь свет) с помощью светоделительной призмы (15) может быть направлен на чувствительный элемент фото- или видеокамеры (17). В оптической схеме микроскопа можно выделить две системы сопряженных плоскостей. Первая включает: нить лампы, диафрагму конденсора (апертурная диафрагма), заднюю фокальную плоскость объектива и диск Рамсдена - маленький (около 3 мм диаметром) светлый кружок, который можно наблюдать, если в нескольких миллиметрах от окуляра расположить лист бумаги. Именно в этой плоскости должен быть расположен зрачок, чтобы весь свет попадал в глаз.

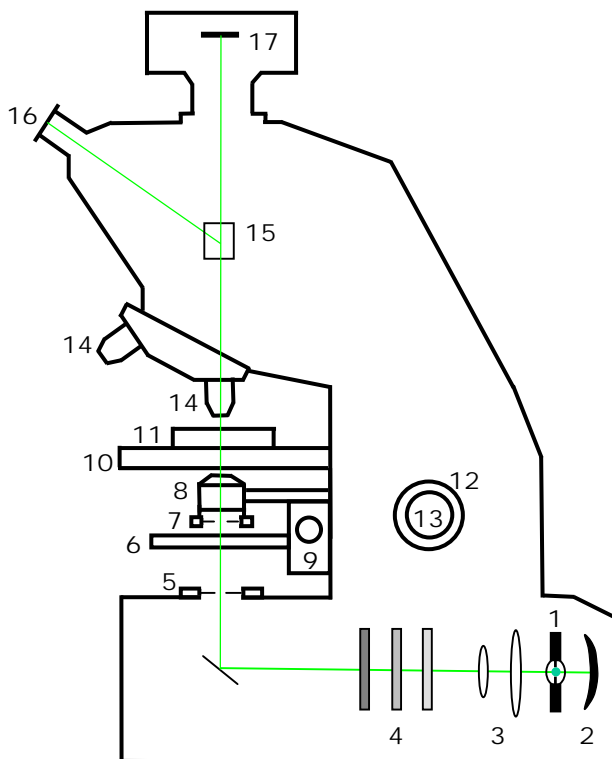


Рис. 1. Принципиальная схема расположения основных узлов современного оптического микроскопа: (1) источник света; (2) зеркало осветителя; (3) система коллекторных линз осветителя; (4) светофильтры; (5) полевая диафрагма; (6) набор колец для наблюдения с использованием метода фазового контраста; (7) апертурная диафрагма конденсора; (8) конденсор; (9) ручка фокусировки конденсора; (10) предметный столик; (11) объект; (12) ручка грубой фокусировки; (13) ручка тонкой фокусировки; (14) объективы; (15) светоделительная призма; (16) окуляр; (17) фото- или видеокамера.

Для настройки освещения обычно рассматривают заднюю фокальную плоскость объектива, которая видна глазом, если вынуть окуляр. Чтобы задняя фокальная

плоскость объектива была видна лучше, ее наблюдают либо с помощью специального маленького микроскопа, который устанавливается на место окуляра, либо с помощью линзы Бертрана, которая находится внутри микроскопа и вводится в оптический путь, когда это необходимо. В последнем случае наблюдение задней фокальной плоскости объектива (и плоскостей, с ней сопряженных) ведется через окуляры.

Вторая система сопряженных оптических плоскостей включает в себя диафрагму поля зрения (полевая диафрагма, 5), препарат (11), первичное изображение и сетчатку глаза. Эта система сопряженных плоскостей видна через окуляры (16).

Для получения качественного изображения исследуемого объекта необходимо правильное расположение всех компонентов оптической системы вдоль главной оптической оси относительно друг друга. Для того чтобы добиться наилучшего разрешения мелких деталей, препарат должен освещаться максимально широким пучком света. Максимальная интенсивность освещения достигается, если спираль лампы осветителя располагается в плоскости, сопряженной с плоскостью препарата. Такая схема освещения носит название критического освещения. Однако в этом случае освещение препарата оказывается неравномерным. Этот недостаток может частично компенсироваться использованием ламп со спиралью специальной формы и матового светофильтра, но существует и другая возможность добиться равномерности освещения – использование схемы освещения, разработанной Августом Кёллером (1866-1948). При настройке света по Кёллеру изображение спирали, создаваемое коллекторными линзами осветителя, находится не в плоскости препарата, а в плоскости апертурной диафрагмы конденсора. В этом случае каждая точка изображения нити лампы равномерно освещает каждую точку объекта.

Метод фазового контраста.

Как правило, для микроскопического анализа используются препараты, окрашенные специальными красителями. В этом случае контраст изображения создается за счет поглощения красителями части падающего на клетки света. Такие объекты носят название амплитудных объектов, так как они создают разницу амплитуд падающей световой волны в разных частях изображения, что воспринимается глазом как разница в интенсивности освещения.

В тоже время, для решения некоторых специальных задач необходим микроскопический анализ неокрашенных («прозрачных») объектов. Неокрашенные

биологические объекты, плохо поглощают свет, поэтому, если микроскоп настроен правильно, при изучении в светлом поле разглядеть какие-либо структуры удастся с большим трудом. Разработано много методов, которые позволяют усилить контраст прозрачных объектов – дифференциально-интерференционный контраст, косое освещение, Хоффмановский контраст и другие. Но наиболее часто для решения такого рода задач используется метод фазово-контрастной микроскопии, основанный на преобразовании разности фаз в разницу амплитуд.

Известно, что при прохождении через прозрачные не окрашенные образцы свет частично дифрагирует (рассеивается), причем, дифрагировавший свет имеет небольшой сдвиг по фазе относительно недифрагировавшей волны. Такие объекты носят название фазовых объектов.

При прохождении света через фазовый объект падающая световая волна делится на две составляющие: **недифрагировавший свет** (S -волна), который проходит через объект, но не взаимодействует с ним, и **дифрагировавший свет** (D -волна), который рассеивается объектом из-за различий в показателе преломления (n) среды (n_0) и объекта (n_1). Если $n_1 > n_0$, D -волна испытает некоторое запаздывание по фазе, по сравнению с S -волной, и наоборот. Величина этого фазового сдвига пропорциональна $n_0 - n_1$. Для биологических объектов этот сдвиг составляет около $1/4$ длины волны. Поскольку показатель преломления и сдвиг по фазе зависят от длины волны λ , S - и D -волна собираются объективом и фокусируются в плоскости первичного изображения, где в результате их интерференции формируется изображение объекта. В связи с тем, что только незначительная часть света подвергается дифракции, проходя через прозрачные биологические объекты, амплитуда D -волны мала по сравнению с амплитудой S -волны. Поэтому P -волна, образующаяся в результате интерференции S - и D -волны, незначительно отличается по амплитуде от S -волны и сдвинута по фазе примерно на $1/20\lambda$. Для увеличения вклада D -волны в формирующееся изображение и получения видимого изменения яркости между объектом и фоном, необходимо уменьшить амплитуду S -волны и дополнительно увеличить сдвиг по фазе таким образом, чтобы он составлял примерно $1/2 \lambda$. Это достигается введением в оптический путь двух элементов: кольцевой диафрагмы конденсора и фазовой пластинки, располагающейся в задней фокальной плоскости объектива (**Рис. 2**). Фазовая пластинка содержит фазовое кольцо — небольшое кольцевое углубление, глубина которого

расчитана таким образом, чтобы обеспечить сдвиг фазы проходящего через нее света на $\frac{1}{4} \lambda$. Фазовое кольцо также делают полупрозрачным, чтобы уменьшить амплитуду проходящего через него света на 70-75%. Угловые размеры фазового кольца немного больше, чем у кольцевой диафрагмы. Поскольку показатель преломления и сдвиг по фазе зависят от длины волны, лучше всего фазовый контраст наблюдать при зеленом свете (λ 500-550 нм), на который рассчитана фазовая пластинка. На практике удовлетворительные результаты можно получить и при использовании «белого» света от лампы накаливания.

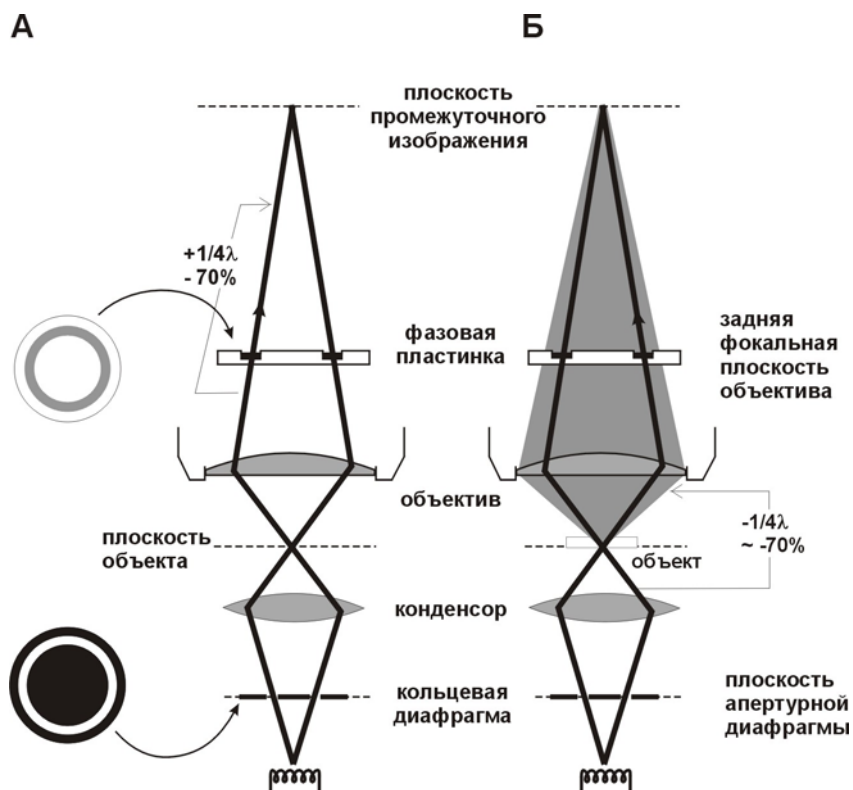


Рис. 2. Формирование изображения в фазово-контрастном микроскопе: в отсутствии (А) и в присутствии объекта (Б). ©Рисунок предоставлен Гольшиевым С.А.

Препарат освещается через кольцевую диафрагму конденсора, и нерассеянный препаратом свет (S-волна) проходит через фазовое кольцо, где его амплитуда уменьшается и происходит ускорение на $\frac{1}{4} \lambda$. Рассеянный на объекте свет (D-волна) отклоняется от первоначального пути и проходит через фазовую пластинку, минуя фазовое кольцо. Таким образом, S- и D-волны становятся близкими по амплитуде и находятся в противофазе ($\frac{1}{4}\lambda + \frac{1}{4}\lambda$). В результате их интерференции в плоскости первичного изображения фазовые объекты выглядят темнее фона и становятся визуально различимыми. Однако, поскольку величина фазового сдвига зависит не только от n , но и от толщины объекта, в очень толстых объектах может происходить значительное замедление D-волны ($\sim 1/2 \lambda$). В этом случае фазовые объекты будут выглядеть светлее фона в результате конструктивной интерференции.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа №1. Настройка освещения по Келеру.

Цель работы: овладение навыками правильной работы на световом микроскопе.

Объект исследования: клеточная линия СПЭВ (эмбриональный почечный эпителий).

Приборы и реактивы: микроскоп, препарат зафиксированных и окрашенных клеток.

Последовательность экспериментальных операций:

1. Включить освещение микроскопа и проверить центровку лампы. Для этого достаточно расположить сразу под конденсором (в случае «прямого» микроскопа) лист бумаги, на котором будет видно изображение нити лампы. Иногда внутри домика лампы устанавливается дополнительное зеркало (**Рис. 1 – 2**), которое позволяет добиться более яркого освещения. В этом случае в качестве источника света служит не только сама спираль лампы, но еще и ее изображение, отраженное зеркалом.

2. Сфокусировать микроскоп на препарат с использованием объектива $\times 10$.

3. Сфокусировать изображение полевой диафрагмы и отрегулировать ее диаметр.

Как уже было отмечено, полевая диафрагма должна находиться в плоскости, сопряженной с плоскостью изображения, а значит, ее изображение должно быть четко видно при наблюдении препарата через окуляры. Глядя в окуляры, необходимо закрыть полевую диафрагму. Изображение диафрагмы может быть не сцентрировано и может быть сильно дефокусировано (т.е. иметь нечеткие края). Диафрагму следует

сфокусировать, перемещая конденсор вверх или вниз. Чтобы контуры диафрагмы были лучше видны, на этом этапе следует закрыть еще и апертурную диафрагму конденсора (**Рис. 1 – 7**). Затем необходимо отцентровать изображение диафрагмы с помощью центровочных винтов конденсора. Проще всего это сделать, если раскрыть полевою диафрагму таким образом, чтобы ее границы приблизились к краю поля зрения.

Таким образом, изображение полевой диафрагмы сцентрировано и размещено в плоскости, сопряженной с плоскостью изучаемого препарата. Теперь диафрагму раскрывают так, чтобы ее границы были вне видимого в окуляры поля зрения. Важно понимать, что изображение диафрагмы должно только немного выходить за пределы поля зрения. Излишне освещая изображение вне поля зрения, можно снизить контрастность (и разрешение) изображения, так как рассеянный (диффрагировавший) свет от освещенной, но невидимой через окуляры части препарата, будет влиять на все изображение. Если препарат предполагается фотографировать, то изображение полевой диафрагмы следует развести таким образом, чтобы было освещено не все видимое через окуляры поле зрения, а только та его часть, которая будет сфотографирована. В данном случае оправа матрицы цифровой камеры выступает в роли диафрагмы поля зрения.

Надо учитывать, что при использовании объективов с небольшим увеличением ($\times 5$ - $\times 10$), диаметр полевой диафрагмы может оказаться недостаточно большим, чтобы полностью заполнить все поле зрения. Если предполагается работать с такими объективами, то следует выбирать конденсор с откидывающейся верхней линзой. Такая линза может быть выведена из оптического пути, при этом увеличивается фокусное расстояние конденсора и размер изображения полевой диафрагмы. В большинстве случаев после выведения верхней откидывающейся линзы из оптического пути, конденсор должен быть вновь сфокусирован.

4. Раскрыть апертурную диафрагму конденсора. В большинстве микроскопов нет необходимости центровать апертурную диафрагму, хотя в ряде конденсоров имеются приспособления для ее центровки. Но сначала надо увидеть изображение этой диафрагмы. Апертурная диафрагма конденсора находится в плоскости, сопряженной с задней фокальной плоскостью объектива, которую можно наблюдать, заменив один из окуляров на специальный микроскоп, либо введя в оптический путь линзу Бертрана.

При полностью закрытой апертурной диафрагме конденсора изображение выглядит контрастным, но мелкие детали не разрешаются. Постепенно раскрывая диафрагму можно наблюдать, как контраст изображения уменьшается, при этом становятся различимы все более тонкие детали. Следует отметить, что если числовая апертура конденсора больше, чем числовая апертура объектива, часть света будет проходить мимо объектива, не участвуя в формировании изображения. Часть этого лишнего света будет рассеиваться (дифрагировать) в препарате и частично попадать в объектив, что приведет к снижению контрастности изображения и уменьшению разрешения.

Поэтому для получения оптимального результата диафрагму конденсора необходимо раскрыть таким образом, чтобы ее изображение занимало примерно 70 - 80% площади задней фокальной плоскости объектива. Если, например, используется объектив с числовой апертурой 1.3 и конденсор с числовой апертурой 0.95, следует раскрыть апертурную диафрагму конденсора полностью. Яркость освещения может быть отрегулирована изменением накала лампы или использованием дополнительных светофильтров.

Практическая работа №2. Настройка фазового контраста.

Цель работы: овладение навыками настройки фазового контраста.

Объект исследования: клеточная линия СПЭВ (эмбриональный почечный эпителий).

Приборы и реактивы: микроскоп, оснащенный оптической системой для наблюдения клеток методом фазового контраста, препарат фиксированных неокрашенных клеток.

Для наблюдения методом фазового контраста необходимы: специальный конденсор и специальные объективы. Конденсор для фазового контраста содержит набор из нескольких кольцевых диафрагм, соответствующих различным объективам. Фазовые объективы отличаются от обычных тем, что в задней фокальной плоскости у них нанесено фазовое кольцо (либо на специальной фазовой пластинке, либо на последней линзе). На корпусе такого объектива имеется маркировка Ph и номер, который указывает размер фазового кольца. Фазовые кольца разных объективов могут иметь одинаковую апертуру. Поэтому и на объективах и на конденсоре фазовые кольца маркируются не увеличением объектива, а условными номерами: Ph1, Ph2, Ph3. Как

правило, кольцевая диафрагма Ph1 соответствует объективам с увеличением $\times 5$ - $\times 10$, Ph2 – объективам $\times 16$ - $\times 40$ (сухие системы) и Ph3 - иммерсионным объективам $\times 40$ - $\times 100$. Для настройки фазового контраста необходимо, чтобы номера кольцевой диафрагмы конденсора и фазового кольца объектива совпадали. Для установки света по методу фазового контраста кроме специальных объективов и конденсора необходим вспомогательный микроскоп, который обычно входит в комплект фазово-контрастного устройства. Иногда внутри микроскопа устанавливается специальная линза Бертрана, которую можно ввести в оптический путь микроскопа, что позволяет изучать заднюю фокальную плоскость объектива непосредственно через окуляры.

Последовательность экспериментальных операций:

1) Убедиться, что все необходимые элементы имеются в микроскопе (выбранный объектив должен иметь фазовое кольцо, конденсор - револьвер и в нем соответствующую объективу фазовую диафрагму).

2) Установить препарат на столик микроскопа и конденсор в режиме светлого поля. Поскольку препарат неокрашен, то для наведения на фокус может понадобиться закрыть апертурную диафрагму конденсора (чтобы увеличить контраст). Не следует пользоваться интенсивно окрашенным препаратом (например, окраска гематоксилин-эозином или азур-эозином). В этом случае фазовый эффект довольно трудно наблюдать, так как он будет налагаться на светлполюное изображение.

3) Установить в микроскопе свет по Келеру (апертурную диафрагму можно не настраивать, так как она будет затем заменена на фазовое кольцо). Изображение препарата станет практически невидимым.

4) Вынуть один окуляр, и установить вместо него вспомогательный микроскоп (или ввести в оптический путь линзу Бертрана). Сфокусировать вспомогательный микроскоп на заднюю фокальную плоскость объектива. При правильной установке на светлом поле будет четко видна серая кольцевая пластинка – фазовое кольцо объектива.

5) Ввести в ход лучей в конденсоре кольцевую (фазовую) диафрагму, соответствующую выбранному объективу. При этом, контраст изображения существенно увеличится. В поле зрения вспомогательного микроскопа диафрагма конденсора будет иметь вид яркого светлого кольца. Если свет установлен правильно,

то светлое и темное кольца в поле зрения будут иметь приблизительно одинаковый диаметр. Они располагаются, как правило, слегка эксцентрично. Если изображение светлого кольца нерезкое, то его следует сделать максимально резким, слегка перемещая конденсор.

6) Совместить два изображения юстировочными винтами фазового кольца конденсора. Светлое кольцо (конденсора) должно расположиться полностью внутри темного кольца (фазовая пластинка в задней фокальной плоскости объектива). Для совмещения колец нельзя пользоваться центровочными винтами конденсора – это приведет к нарушению установки света.

7) Заменить вспомогательный микроскоп на окуляр и приступить к наблюдениям.

Важно! Настройка фазового контраста выполняется независимо для каждого объектива микроскопа и для каждого препарата, если их оптическая толщина различается. Метод фазового контраста очень чувствителен к чистоте предметного и покровного стекол, а также фронтальной поверхности линзы конденсора. Даже незначительное загрязнение покровного стекла способно свести к минимуму фазовый эффект от препарата. С другой стороны, учитывая сравнительно небольшую апертуру фазового кольца, для получения фазового контраста даже для иммерсионных объективов возможно применение конденсоров с меньшей апертурой, чем для светлого поля. Соответственно такие конденсоры могут иметь больший рабочий отрезок и позволяют работать со значительно более толстыми препаратами. Поскольку оптимальные условия наблюдения фазового контраста соответствуют применению зеленого света, то требования к хроматической коррекции объективов невелики – даже меньше, чем при микроскопии в светлом поле. Поэтому для наблюдения клеток методом фазового контраста можно с успехом использовать любые типы объективов.

Глава 2. **Культивирование клеток *in vitro*.**

1. Теоретическая часть.

Большая часть экспериментальных данных классической цитологии и гистологии была получена при изучении препаратов, изготовленных из тканевых образцов. Это в значительной степени ограничивало возможности изучения тонкой организации клеток и процессов их функционирования, и причин тому несколько. Во-первых, даже самые простые ткани содержат различные типы клеток. Гетерогенность популяции в составе нормальной ткани является основой ее стабильности, так как позволяет избежать влияния особенностей отдельных клеток на состоящие из них более сложные системы (ткань, орган, целый организм). Во-вторых, к клеткам в составе живого организма практически невозможно контролируемо доставить интересующее исследователя вещество (например, какой-либо ингибитор). Клеточные события быстротечны, а потому любое вещество при экспериментальных воздействиях должно поступать ко всем клеткам одновременно. И, наконец, при работе с клетками в составе ткани практически невозможно изучать живые клетки (исключением являются небольшие водоросли и беспозвоночные, которые можно исследовать под микроскопом целиком).

Следует отметить, что исследования классической цитологии основывались на изучении фиксированных образцов, что не всегда приводило к верным выводам. Чтобы избежать подобных ошибок были разработаны методы выделения кусочков ткани или отдельных клеток из организма или органа с последующим культивированием их *in vitro* в специально подобранных условиях.

Метод клеточных культур.

Метод клеточных культур широко используется современными исследователями, работающими как в различных областях экспериментальной клеточной биологии, так и в областях, связанных с прикладными биотехнологическими и медицинскими проблемами. Культура клеток как объект исследования особенно удобна в тех случаях, когда требуется однородная (а иногда и синхронная) популяция экспериментальных клеток или одномоментное (кратковременное или длительное) воздействие специфических ингибиторов

метаболических процессов - факторов роста, гормонов, либо иных естественных или синтетических агентов. Используя культуру клеток, можно не только получить гомогенную популяцию генетически однородных клеток, но и полностью контролировать условия, в которых они находятся, в том числе и в ходе эксперимента, что обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. Огромным достоинством метода является возможность наблюдать за клетками прижизненно. Работа с живыми клетками дает возможность изучать реальную жизнедеятельность и биологию клетки, а не ее химию, что было характерно для работ прошлого века. Именно эксперименты с использованием прижизненных наблюдений позволили уйти в конечном итоге от упрощенных молекулярно-биологических теорий, основанных на результатах изучения свойств отдельных молекул или биохимических реакций *in vitro*, и дали основной материал для современного понимания молекулярной и надмолекулярной организации живых клеток.

Основные типы клеточных культур.

Культивирование живых клеток оказалось возможным и получило столь широкое распространение благодаря одной замечательной особенности – большинство типов клеток растений и животных способно выживать и размножаться вне организма, а иногда – при соблюдении определенных условий – даже претерпевать сложные тканевые дифференцировки. Условия для культивирования выделенных клеток со временем совершенствовались, однако основные принципы и правила, сформулированные еще на рубеже XIX-XX веков, остаются неизменными до сих пор.

Метод культуры клеток берет начало с экспериментов Ру (Roux, 1885), в которых впервые была продемонстрирована принципиальная возможность существования в живом виде клеток, выделенных из организма. В опытах Ру клетки куриного эмбриона сохраняли жизнеспособность в солевом растворе вне тела животного. Позднее, в 1907 году, нейробиолог Гаррисон (Harrison) получил первую клеточную культуру – культуру нервных клеток. Он не ставил перед собой такой специальной задачи и произошло столь знаменательное событие следующим образом. Гаррисон был вовлечен в происходившую в то время между нейробиологами дискуссию относительно нейронной доктрины («Каждое нервное волокно образуется, вырастая из одной нервной клетки, а не путем слияния многих клеток»), он искал

подтверждающие данное утверждение экспериментальные доказательства. Гаррисону удалось культивировать спинной мозг амфибий *in vitro* и на живых клетках показать, что аксоны образуются в виде выростов отдельных нервных клеток.

В дальнейшем, исследования Карреля (Carrel, 1913) показали, что клетки могут расти в культуре в течение длительного времени, если соблюдать два главных условия культивирования – снабжать клетки необходимыми питательными веществами и обеспечить асептические условия на всех стадиях работы. При соблюдении этих условий, как установил Эрл (Earle, 1948), одиночные клетки способны формировать клеточные клоны (автор исследовал мышинные фибробласты) и, немногим позднее, была получена первая перевиваемая клеточная линия из карциномы шейки матки (HeLa) (Gey, 1952).

Используемые в клеточной биологии культуры могут быть разделены на два типа – *клеточные и тканевые культуры*. Первые представляют собой культивируемые *in vitro* клетки, растущие в виде монослоя, которые не формируют каких-либо трехмерных комплексов. Такие культуры пригодны для изучения структурно-функциональной организации клеток, особенностей клеточных дифференцировок, для изучения действия разнообразных веществ на клетки и отдельные клеточные органоиды. Но в составе организма клетки формируют сложные, относительно однородные комплексы – ткани, отличительными особенностями которых является гетерогенность клеточного состава, наличие выраженного межклеточного вещества и трехмерная упорядоченность в организации клеток различных типов. Многие свойства тканей не сводятся к свойствам образующих их клеток. Такие специфические тканевые свойства изучаются на *тканевых культурах*. Простейшим примером тканевой культуры является извлеченный из организма кусочек органа, который затем культивируется вне организма. В настоящее время экспериментально определены стандартные условия, в которых удастся добиться формирования *in vitro* комплексов клеток, которые в ходе развития приобретают свойства – как морфологические, так и физиологические – близкие к свойствам, характерным для нормальных тканей организма. В частности, вне организма можно добиться формирования кожных эпителиальных пластов, причем внутри таких пластов клетки (кератиноциты) упорядоченно дифференцируются, погибают и слущиваются. Эта система напоминает

многослойный эпителий, в котором базальные клетки делятся, а не базальные - дифференцируются и, в конечном итоге, погибают. Более того, получаемые *in vitro* пласты кератиноцитов могут использоваться для восстановления кожных покровов после ожогов и при лечении трофических язв. Понятно, что использование такого рода тканевых культур позволяет исследовать целый ряд процессов, изучение которых невозможно при работе с клеточными культурами.

В целом, культивирование тканевых культур – процесс более сложный и трудоемкий, он требует значительной квалификации экспериментатора. В рамках настоящего практикума студентам предлагается овладеть методами работы с культивируемыми клетками, и в дальнейшем в данной главе речь пойдет исключительно о клеточных культурах. Если клетки были взяты непосредственно из животного и культивируются *in vitro*, то такая культура называется *первичной*. Поскольку клетки в такой культуре размножаются, через некоторое время они полностью покрывают всю доступную поверхность субстрата. Их необходимо отделить от субстрата и перенести на новый субстрат, одновременно снизив концентрацию клеток, чтобы обеспечить их после прикрепления к субстрату свободной поверхностью для роста и размножения. Этот процесс называется пересевом клеток или их пассированием (субкультивированием). При субкультивировании клетки могут оставаться диплоидными и сохранять характерные особенности исходного материала. Такую культуру называют *клеточной линией*. Важно понимать, что в клеточной линии могут присутствовать несколько различных клеточных типов, а некоторые характеристики клеток могут быть нестабильными, способными изменяться со временем. Добиться однородности клеточной линии можно, используя процедуру *клонирования*, т.е. получения клеточной линии из индивидуальной клетки.

Поддерживать соматические клетки в культуре возможно в течение относительно небольшого времени. Если клетки получены из эмбриональных тканей, то они сохраняют свою нормальную морфологию и физиологию примерно в течение 50 генераций. За это время из каждой клетки исходной первичной культуры может образоваться около 10^{22} клеток. Затем начинается процесс дегенерации клеток, и они постепенно погибают. В случае, если клетки получены из тканей взрослого организма, клетки переживают в культуре еще меньше - около 20 (или даже менее)

генераций. Такая ограниченность размножения соматических клеток вне организма получила название *предела Хейфлика*, причем причины существования такого эффекта не прояснены в полной мере до сих пор. Очень редко в составе клеточной линии спонтанно появляются клетки, которые становятся бессмертными (*иммортилизируются*). Такие клетки постепенно вытесняют окружающие клетки, что приводит к установлению *клеточного штамма*. Частоту подобных трансформаций можно увеличить, обрабатывая первичные клетки мутагенами или некоторыми вирусами (например, вирусом полиомы или вирусом SV40). В качестве примера можно привести штамм мышиных L-клеток, который был получен после обработки фибробластов метилхолантреном. Позднее из этого штамма были клонированы клетки L929, которые, наряду с другими клеточными линиями, будут использоваться в ходе работы на практике.

Из сказанного выше понятно, что работать с постоянной клеточной культурой во многих случаях намного легче, чем с первичными клетками, и получаемые при этом результаты легко воспроизводимы. Но для получения постоянной клеточной культуры необходимо, чтобы нормальные клетки были трансформированы. Однако в природе существуют клетки, которые трансформированы уже в самом организме – *опухолевые (неопластические) клетки*. Некоторые свойства опухолевых клеток могут значительно отличаться от свойств клеток-предшественников, и далеко не все неопластические клетки способны к неограниченному росту в системе *in vitro*. Тем не менее, культуры достаточно часто получают не из нормальных клеток, а из клеток опухоли; например, именно из опухолей получены многие широко используемые штаммы клеток человека. В частности, клетки HeLa исходно выделены из ткани карциномы шейки матки. Эти клетки сохраняют многие особенности исходного эпителия, а по мере использования из этого штамма были получены разнообразнейшие клоны, среди которых есть даже способные расти в суспензионном состоянии (HeLa S3).

Культуральная посуда.

При культивировании клеток используется специальная посуда – флаконы, пипетки, чашки Петри и т.д. Вся посуда, используемая для культивирования и посева клеток, должна быть стерильной. Стерилизация посуды и инструментов в зависимости от условий может осуществляться несколькими способами:

радиоактивным облучением, автоклавированием, обжиганием в пламени горелки либо облучением ультрафиолетом.

Посуда для культивирования клеток может быть стеклянная или пластиковая. Некоторые клетки не могут расти на стеклянной поверхности или на пластике, поэтому перед использованием необходимо покрывать поверхности культуральной посуды специальным субстратом (коллаген, фибронектин, поли-L-лизин). В этих случаях необходимое вещество предварительно наносится на поверхность чашки Петри или флакона для культивирования, высушивается, стерилизуется, и лишь затем производится посев клеток на обработанную поверхность.

Как уже указывалось, через некоторое время после посева клетки полностью заполняют всю имеющуюся поверхность. В этот момент их необходимо пересевать: клетки сначала снимают с субстрата и отделяют друг от друга, переводя в суспензионное состояние, после чего необходимое число клеток переносится в новую посуду для культивирования. Для того, чтобы снять клетки со стекла и перевести в состояние суспензии, используют ферменты или хелатные соединения, диссоциирующие клетки и нарушающие связь клетки с подложкой: 0,25% раствор трипсина, раствор Версена (натриевая соль ЭДТА, приготовленная на физиологическом фосфатном буфере) либо их смесь в различных, экспериментально подобранных соотношениях.

Среды для культивирования клеток.

Культивирование клеток *in vitro* проводится в культуральных средах, которые должны содержать все компоненты, необходимые для нормального функционирования и пролиферации клеток вне организма. Рекомендуемые среды для наиболее часто используемых клеточных культур можно найти в справочных пособиях по культивированию клеток. Обычно название рекомендуемой среды культивирования указывают в паспорте культуры при поставке ее из Банка клеточных культур.

Культуральная среда представляет собой раствор аминокислот, витаминов, глюкозы и множества других веществ. Среды составляют на основе сбалансированных буферных солевых растворов, которые служат источником

некоторых физиологически важных ионов и обеспечивают необходимое *осмотическое давление*. В организме клетки находятся в *изотонических условиях* - они окружены межклеточной жидкостью, через которую происходит обмен веществ, позволяющий клеткам поддерживать постоянство внутренней среды. Клетки, выделенные *in vitro*, также должны культивироваться в изотонических условиях.

Составы сбалансированных буферных солевых растворов (раствор Эрла, раствор Хенкса и т.д.), также как и изготовленных на их основе питательных культуральных сред (минимальная среда Игла (MEM), минимальная среда Игла в модификации Дюльбекко (DMEM), среда 199, среда F-12, среда L-15 и др.) можно найти в каталогах фирм-производителей. Для нормальной жизнедеятельности клеток в культуре необходимо, чтобы pH среды находился в достаточно узком диапазоне 7.2-7.5, что достигается в большинстве случаев с помощью системы бикарбонат натрия/CO₂. При концентрации 5% CO₂ в воздухе эта буферная система обеспечивает pH среды 7.4. Важным фактором, влияющим на жизнедеятельность клеток, является также температура культивирования, которая зависит от вида животного, из которого выделены клетки. Оптимальной для клеток холоднокровных животных считается температура около 25° С, а для теплокровных - 37° С. Большинство клеток теплокровных животных (в том числе и те, с которыми предполагается работать на занятиях практикума) культивируют в CO₂-инкубаторах, поддерживающих необходимую температуру (37° С), 100% влажность и заданную концентрацию CO₂ (5%).

Для контроля состояния среды в нее обычно добавляют индикатор, например, феноловый красный. Феноловый красный при pH 7,4 имеет насыщенный красный цвет, который изменяется на пурпурный при защелачивании среды, и желтеет ее закислении.

Для нормального роста клетки, помимо содержащихся в культуральной среде аминокислот, нуждаются также в специфических ростовых факторах. Поэтому в культуральную среду, используемую в работе, добавляют сыворотку крови млекопитающих (чаще всего, крупного рогатого скота). Для ведения ряда культур, особенно требовательных к ростовым факторам, используют эмбриональные сыворотки, либо сыворотки новорожденных телят. Обычная концентрация сыворотки в среде от 5 до 10%. Перед началом работы со средой в нее необходимо добавить L-

глутамин, так как эта аминокислота неустойчива и быстро разлагается в водном растворе.

Для обеспечения стерильности в среду добавляют антибиотики, а иногда и антимикотики, которые производятся в виде стерилизованных концентрированных растворов.

Таким образом, приготовление полной среды для культивирования клеток сводится к смешиванию коммерческой культуральной среды нужного состава (выбранной в зависимости от типа клеток), сыворотки, L-глутамина и антибиотиков.

Следует помнить, что по мере культивирования клеток состав среды в культуральной емкости изменяется – истощаются компоненты, потребляемые клетками, а в среду поступают продукты клеточной активности. Например, в ходе жизнедеятельности клетки вырабатывают собственные факторы роста, которые, попадая в культуральную среду, дополнительно активируют рост и пролиферацию культуры. Такая среда называется *кондиционированной*. Кондиционированная среда более комфортна для жизни клеток, поэтому в некоторых случаях (например, если концентрации клеток в сосуде невелика) при пересеве клеток в новую емкость используют смесь свежей среды с предварительно кондиционированной.

Организация работы с культивируемыми клетками.

Главным правилом, основой работы с культивируемыми *in vitro* клетками является соблюдение стерильности. Поскольку лабораторное помещение в целом не может быть свободно от бактерий и спор грибов (за исключением стерильных культуральных комнат), для культивирования клеток применяют специальные устройства, внутри которых обеспечивается полная стерильность - ламинарные боксы.

Существует два типа таких боксов (**Рис. 1**). В ламинарных боксах первого типа поток воздуха направлен горизонтально от задней стенки, в которую встроены мелкопористые фильтры, задерживающие бактерии и споры грибов и, таким образом, обеспечивающие поступление внутрь ламинара стерильного воздуха. В боксах второго типа стерильный воздух движется вертикально, сверху вниз. На верхней панели бокса располагаются фильтры, которые и обеспечивают стерильность воздуха, а в поддоне имеются отверстия, сквозь которые воздух выходит из стерильной зоны. Из-под поддона воздух идет за задней стенкой бокса вверх, попадает в пространство

над фильтрами, и сквозь них вновь попадает в стерильную зону. Следует принимать во внимание, что поскольку передняя стенка такого ламинарного бокса открыта, воздух из комнаты также может частично проникать внутрь. Таким образом, зона шириной около 20 см вдоль переднего края бокса не является стерильной и работать в ней нельзя.

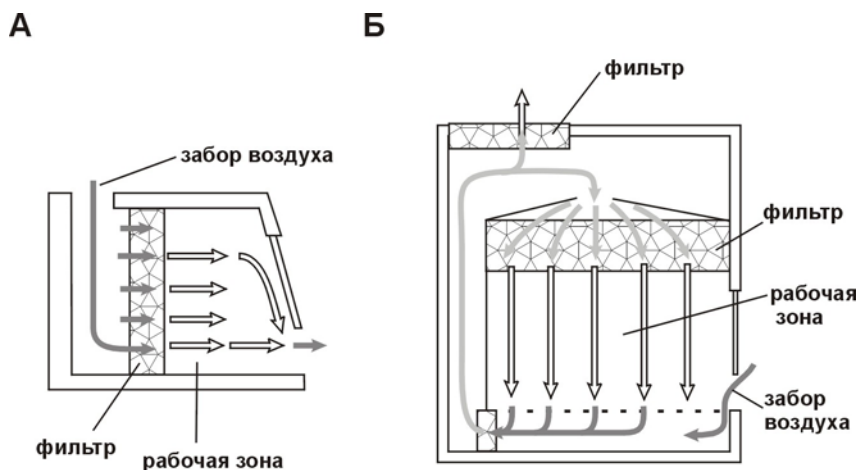


Рис. 1. Ламинарный бокс с горизонтальным (А) и вертикальным током воздуха (Б).

©Рисунок предоставлен Голышевым С.А.

Для обеспечения стерильности любые предметы, вносимые в бокс, а также перчатки на руках экспериментатора необходимо обработать 70% спиртом. Кроме того, при работе следует помнить правила, вытекающие из конструктивных особенностей ламинарных боксов каждого типа. Горизонтальное направление тока воздуха в ламинарных боксах первого типа обеспечивает стерильность внутри бокса при соблюдении следующих условий: во-первых, нельзя располагать несколько предметов на одной линии, параллельной току воздуха; а, во-вторых, руки работающего не должны располагаться над открытой посудой. Главное требование к работе с ламинарными боксами второго типа состоит в том, чтобы нестерильные предметы не

оказывались над открытыми стерильными емкостями. Например, при работе с пипеткой необходимо наклонять емкости, из которых извлекаются жидкости, чтобы пипетка, насос и рука работающего располагались сбоку, а не над стерильной посудой

Криоконсервация (замораживание) клеток.

Как в специально организованных Банках клеточных культур, так и в исследовательских лабораториях, длительное хранение клеточных линий осуществляется в криохранилищах, заполненных жидким азотом, при температуре его кипения (-196°C). Для того, чтобы формирующиеся в процессе криоконсервации кристаллы льда не разрушили клетки, используют криопротекторы - глицерин, диметилсульфоксид (DMSO), либо культуральную сыворотку (возможно использование комбинации нескольких криопротекторов).

До настоящего времени не существует удовлетворительной теории, полностью описывающей процессы происходящие при криоконсервации клеток. Однако известны главные правила, которые необходимо соблюдать для того, чтобы процедура замораживания клеток, их последующего размораживания и пассирования была для них наименее травматична - замораживание в интервале температур от 0°C до -20°C должно осуществляться очень медленно, дальнейшее охлаждение (от температуры -80°C и ниже) должно осуществляться очень быстро; а размораживание клеток должно проходить очень быстро.

Дело в том, что при температуре ниже 0°C в клетках начинают образовываться кристаллы льда, которые растут по мере дальнейшего понижения температуры. Медленное понижение температуры позволяет предотвратить образование кристаллов льда. Параллельно уменьшению количества воды, концентрация в клетке таких веществ, как, электролиты, медленно увеличивается в оставшейся воде, и именно их высокая концентрация по данным ряда авторов вызывает наиболее сильные повреждения клеток во время замораживания. Максимальные изменения, вызываемые высокой концентрацией электролитов, грозят клетке при понижении температуры до -5°C до -10°C . При более низких температурах, до -20°C , повреждения также возможны, но они менее значительны. Медленное охлаждение в интервале температур от 0°C до -20°C позволяет свести к минимуму повреждение клеток - при соблюдении этого условия образование кристаллов льда происходит вне клетки и не происходит ее обезвоживания. Оптимальной при охлаждении клеток в интервале от

0°C до -80°C считается скоростью падения температуры 1°C в минуту. Охлаждение до более низких температур должно осуществляться по возможности быстро.

Существует целый ряд охлаждающих жидкостей, способных поддерживать температуру, достаточную для замораживания клеток. Однако наибольшее распространение получил жидкий азот, имеющий, как уже указывалось, температуру кипения -196°C. Преимущества жидкого азота состоят в его низкой стоимости и доступности, а также в том, что он не влияет на pH консервируемых образцов и не оставляет следов при испарении. Температурный предел для эффективного хранения клеток – не выше -130°C, поскольку при температуре ниже минус 130°C любая химическая и физическая активность минимальна.

При криоконсервации клеток следует также помнить, что для соблюдения оптимальных температурных условий необходимо замораживать клетки в малых объемах, что обеспечивает быстрый и равномерный теплообмен в пробе.

Процесс размораживания клеток должен быть максимально быстрым. Этого можно добиться, поместив ампулу из жидкого азота непосредственно в водяную баню (температура +37°C). Как только клеточная суспензия оттаит, ее следует немедленно развести предварительно прогретой культуральной средой соответствующего состава и перенести во флаконы для культивирования. После прикрепления клеток к субстрату (приблизительно через 2-4 часа после перенесения клеток в культуральный флакон) среду необходимо заменить на свежую для удаления криопротекторов и мертвых клеток.

Клонирование.

Одним из основных преимуществ культуры клеток как экспериментальной системы является ее относительная однородность. Однако достаточно часто у экспериментатора возникает задача получить культуру со строго определенными свойствами, в то время как добиться однородности проявления этих свойств каждой клеткой культуры невозможно. Особенно остро такая проблема встала с распространением метода трансфекции клеток. Допустим, после трансфекции получена культура, часть клеток которой (но далеко не вся популяция) экспрессируют интересующий исследователя белок. А исследователю для решения поставленной задачи необходима культура, все клетки которой экспрессировали бы исследуемый

белок. Причем уровень экспрессии должен быть примерно одинаков. В таком случае однородности клеточной линии можно добиться путем *клонирования клеток*.

Клоном называют популяцию клеток, происходящих из одной клетки-предшественника. Существует несколько различных процедур клонирования, из которых мы кратко рассмотрим одну. Предположим, что после трансфекции часть клеток культуры экспрессирует зеленый флуоресцентный белок (GFP), слитый с другим белком, входящим в состав определенной клеточной органеллы. Для клонирования клетки снимают с поверхности субстрата, переводят в состояние суспензии соответствующим диссоциирующим реагентом (0,25% раствор трипсина, раствор Версена, либо их смесь) и разбавляют средой так, чтобы в конечной суспензии концентрация клеток составила приблизительно 10 клеток на 1 мл. Полученную суспензию разливают в 96-луночную планшетку, по 100 микролитров в каждую лунку. В среднем в одной лунке должна оказаться одна клетка, причем с некоторой вероятностью эта клетка экспрессирует меченный GFP белок. Через две недели из каждой клетки вырастет небольшая колония клеток. Исследователю остается лишь воспользоваться флуоресцентным микроскопом и отобрать лунки, в которых вырос клон, экспрессирующий GFP-слитый белок. Стандартная процедура клонирования предусматривает далее последовательный пересев клеток в 24-луночную и 6-луночную планшетки, поскольку такой «пошаговый» подход обеспечивает постепенное увеличение площади субстрата и объема культуральной среды и дает возможность клеткам в должной мере кондиционировать культуральную среду, что способствует нормальной жизнедеятельности клеток клона. В дальнейшем клетки пересевают в стандартные культуральные флаконы.

Успех клонирования зависит от множества факторов, среди которых решающую роль играет аккуратность исследователя. Большое значение имеет тип клонируемых клеток, так как некоторые клетки в принципе не способны кондиционировать окружающую культуральную среду, когда растут в низкой концентрации. Такие клетки необходимо выращивать, используя предварительно кондиционированную среду. Вместе с тем, несмотря на сложность и большие затраты времени, клонирование клеток позволяет решить огромный круг задач, а потому находит все более широкое применение.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа №1: Пересев клеток культуры ткани из одного культурального флакона в другой.

Цель работы: получить практические навыки работы с клеточными культурами в ламинарном боксе.

Объект исследования: клеточная линия HeLa.

Приборы и реактивы:

Ламинарный бокс, пластиковая посуда, культуральная среда DMEM/F-12, сыворотка КРС, антибиотик-антимикотик (Sigma), автоматические микропипетки (1000, 200 и 10 мкл).

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Прогреть в термостате до необходимой температуры флакон с соответствующей данному типу клеток культуральной средой и флакон с раствором, предназначенным для снятия клеток со стекла.
 - 2) Простерилизовать ламинарный шкаф в течение 40-60 мин. Перед началом работы выключить ультрафиолетовую лампу и включить в ламинарном шкафу осветительную лампу. Проверить наличие в шкафу стерильных пипеток, пинцетов, штативов, культуральных флаконов, пробирок и другой необходимой культуральной посуды.
 - 3) Надеть резиновые перчатки и обработать их 70% раствором этилового спирта.
 - 4) В ламинарный шкаф внести, предварительно обработав 70% раствором этилового спирта, флакон с соответствующей культуральной средой, флакон со смесью для снятия клеток со стекла и флакон с культивируемыми клетками.
- Важно! Обработке 70% раствором этилового спирта подвергать в дальнейшем любую посуду, инвентарь, а также перчатки работающего при внесении извне в ламинарный шкаф!**
- 5) В ламинарном шкафу слегка покачать культуральный флакон для того, чтобы погибшие клетки оторвались от субстрата и, открыв культуральный

флакон, аккуратно (не касаясь края стакана) слить культуральную среду в стакан для слива.

- 6) Используя соответствующее для данного типа клеток растворы (0,25% раствор трипсина, раствор Версена (раствор ЭДТА, приготовленный на физиологическом фосфатном буфере) либо их смесь в различных экспериментально подобранных соотношениях) снять клетки со стекла и перевести их в состояние суспензии. Для этого внести во флакон первую порцию выбранного раствора, аккуратно покачав, слить ее и внести вторую порцию раствора. Закрыть флакон.
- 7) Под визуальным контролем, используя инвертированный микроскоп, следить за дезинтеграцией монослоя клеток и их ошариванием. После появления промежутков между клетками внести культуральный флакон в ламинарный шкаф, открыть культуральный флакон, аккуратно (не касаясь края стакана) слить большую часть раствора в стакан для слива, оставив незначительное количество во флаконе. Закрыть флакон.

Важно! Не передержать клетки в растворе трипсина или Версена, во избежание их повреждения!

- 8) Поместить флакон в CO₂-инкубатор или термостат на 2-3 мин. Вынуть флакон, интенсивно встряхнуть его несколько раз для снятия клеток с подложки. Используя инвертированный микроскоп, проследить за тем, чтобы все клетки перешли в суспензионное состояние.
- 9) Внести культуральный флакон в ламинарный шкаф, открыть флакон, добавить в него 10 мл культуральной среды, используя пипетку с тонким носиком. Суспендировать клетки.
- 10) Слить излишки культуральной среды с клеточной суспензией.
- 11) Долить в культуральный флакон соответствующую полную среду до нормального объема.
- 12) Поместить оба флакона в CO₂-инкубатор или термостат для дальнейшего культивирования.

Практическая работа № 2: Пересев клеток культуры ткани на предметные стекла для проведения экспериментов с клетками.

Цель работы: получить практические навыки работы с клеточными культурами.

Объект исследования: клеточная линия HeLa.

Приборы и реактивы:

Ламинарный бокс, пластиковая посуда, полная культуральная среда DMEM/F-12 с сывороткой и антибиотиком (Sigma), раствор трипсина, раствор Версена, автоматические микропипетки (1000, 200 и 10 мкл).

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Прогреть в термостате до необходимой температуры флакон с соответствующей культуральной средой и флакон со смесью для снятия клеток со стекла.
- 2) Простерилизовать ламинарный шкаф в течение 40-60 мин. Поместить чашки Петри с разложенными в них покровными стеклами выбранного для экспериментов размера под ультрафиолетовой лампой для стерилизации. Перед началом работы выключить ультрафиолетовую лампу и включить в ламинарном шкафу осветительную лампу. Проверить наличие в шкафу стерильных пипеток, пинцетов, штативов, культуральных флаконов, пробирок и другой необходимой культуральной посуды.
- 3) Надеть резиновые перчатки и обработать их 70% раствором этилового спирта
- 4) В ламинарный шкаф внести, предварительно обработав 70% раствором этилового спирта, флакон с соответствующей культуральной средой, флакон со смесью для снятия клеток со стекла и флакон с культивируемыми клетками.

Важно! Обработке 70% раствором этилового спирта подвергать в дальнейшем любую посуду, инвентарь, а также перчатки работающего при внесении извне в ламинарный шкаф!

- 5) В ламинарном шкафу слегка покачать культуральный флакон, для того, чтобы погибшие клетки оторвались от субстрата и, открыв культуральный флакон, аккуратно (не касаясь края стакана) слить культуральную среду в стакан для слива.

- 6) Используя соответствующие для данного типа клеток растворы (0,25% раствор трипсина, раствор Версена (раствор ЭДТА, приготовленный на физиологическом фосфатном буфере) либо их смесь в различных экспериментально подобранных соотношениях) снять клетки со стекла и перевести их в состояние суспензии. Для этого внести во флакон первую порцию выбранного раствора, аккуратно покачав, слить его и внести вторую порцию раствора. Закрывать флакон.
- 7) Под визуальным контролем, используя инвертированный микроскоп, следить за дезинтеграцией монослоя клеток и их ошариванием. После появления промежутков между клетками внести культуральный флакон в ламинарный шкаф, открыть культуральный флакон, аккуратно (не касаясь края стакана)) слить большую часть раствора в стакан для слива, оставив незначительное количество во флаконе. Закрывать флакон.

Важно! Не передержать клетки в растворе трипсина или Версена, во избежание их повреждения!

- 8) Поместить флакон в в CO₂-инкубатор или термостат на 2-3 мин. Вынуть флакон, интенсивно встряхнуть его несколько раз для снятия клеток с подложки. Используя инвертированный микроскоп, проследить за тем, чтобы все клетки перешли в суспензионное состояние.
- 9) Внести культуральный флакон в ламинарный шкаф, открыть флакон, добавить в него 10 мл культуральной среды, используя пипетку с тонким носиком, суспендировать клетки. Используя камеру Горяева, подсчитать количество клеток в суспензии и определить степень разведения среды, необходимую для получения требуемой условиями эксперимента концентрации клеток. При достаточном опыте работы для определения концентрации высеваемых на стекла клеток можно использовать метод пропорциональных разведений, учитывая плотность клеток в исходном флаконе и соотношение площадей исходной и конечной поверхностей посева.
- 10) Слить излишки культуральной среды, содержащей клеточную суспензию.
- 11) Добавить в культуральный флакон соответствующую полную среду в объеме, требуемом для заполнения всех заготовленных чашек Петри с

простерилизованными под ультрафиолетом стеклами (из расчета 2-2,5 мл суспензии на чашку Петри, имеющую диаметр 40 мм). Суспендировать клетки. Перенести суспензию клеток в чашки Петри, внимательно следя за тем, чтобы струя жидкости попадала на стекла сверху, не позволяя им всплывать.

- 12) Поместить чашки Петри и флакон, из которого пассировали культуральные клетки, в CO₂-инкубатор или термостат для дальнейшего культивирования.

Практическая работа № 3: Подготовка клеток к криоконсервации (замораживание клеток культуры ткани).

Цель работы: получить практические навыки криоконсервации клеток.

Объект исследования: клеточная линия HeLa.

Приборы и реактивы:

Ламинарный бокс, пластиковая посуда, криопробирки, полная культуральная среда DMEM/F-12 с сывороткой и антибиотиком (Sigma), раствор трипсина, раствор Версена, автоматические микропипетки (1000, 200 и 10 мкл), центрифуга, криохранилище.

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Простерилизовать ламинарный шкаф в течение 40-60 мин. Перед началом работы выключить ультрафиолетовую лампу и включить в ламинарном шкафу осветительную лампу. Проверить наличие в шкафу стерильных пипеток, пинцетов, штативов, культуральных флаконов, пробирок для центрифугирования, криопробирок и другой необходимой культуральной посуды.
- 2) Надеть резиновые перчатки и обработать их 70% раствором этилового спирта.
- 3) В ламинарный шкаф внести, предварительно обработав 70% раствором этилового спирта, флаконы с соответствующими культуральными средами, флакон со смесью для снятия клеток со стекла, флакон со смесью для замораживания клеток и флакон с культивируемыми клетками.

Важно! Обработке 70% раствором этилового спирта подвергать в дальнейшем любую посуду, инвентарь, а также перчатки работающего при внесении извне в ламинарный шкаф!

- 4) В ламинарном шкафу, используя соответствующее для данного типа клеток растворы (0,25% раствор трипсина, раствор Версена (раствор ЭДТА, приготовленный на физиологическом фосфатном буфере) либо их смесь в различных экспериментально подобранных соотношениях) снять клетки со стекла и перевести в состояние суспензии. Для этого внести во флакон первую порцию выбранного раствора, аккуратно покачав, слить его и внести вторую порцию раствора. Закрывать флакон.
- 5) Под визуальным контролем, используя инвертированный микроскоп, следить за дезинтеграцией монослоя клеток и их ошариванием. После появления промежутков между клетками внести культуральный флакон в ламинарный шкаф, открыть культуральный флакон, аккуратно (не касаясь края стакана)) слить большую часть раствора в стакан для слива, оставив незначительное количество во флаконе. Закрывать флакон.

Важно! Не передержать клетки в растворе трипсина или Версена, во избежание их повреждения!

- 6) Поместить флакон в CO₂-инкубатор или термостат на 2-3 мин. Вынуть флакон, интенсивно встряхнуть его несколько раз для снятия клеток с подложки. Используя инвертированный микроскоп, проследить за тем, чтобы все клетки перешли в суспензионное состояние.
- 7) Внести культуральный флакон в ламинарный шкаф, открыть флакон. Суспендировать клетки, используя пипетку с тонким носиком, в 10 мл соответствующей полной среды, далее перенести суспензию в полном объеме в стерильную 10-мл пробирку для центрифугирования
- 8) Центрифугировать 5 мин при 1000g
- 9) В ламинарном шкафу слить супернатант с образовавшегося осадка клеток.
- 10) Суспендировать осадок в 1 мл среды следующего состава:
10% стерильного раствора DMSO,
20% сыворотки,
70% соответствующей среды.

- 11) Перенести суспензию в стерильные криопробирки, тщательно закрутить криопробирки. Подписать криопробирки маркером, устойчивым к воздействию воды и низких температур.
- 12) Криопробирки поместить в контейнер и перенести в низкотемпературную морозильную камеру (-80 °С) на 24 ч.
- 13) Перенести пробирки из морозильной камеры в емкость с жидким азотом, а затем в криохранилище, предварительно выяснив номера свободных ячеек
- 14) Занести номера ячеек, к которые помещены криопробирки с замороженными клетками, в лабораторный журнал, указав тип культуры, источник, из которого она поступила, дату замораживания и фамилию сотрудника, производившего замораживание клеток.

Практическая работа № 4: Размораживание и пассирование содержавшихся в криохранилище клеток культуры ткани.

Цель работы: получить практические навыки размораживания клеток.

Объект исследования: клеточная линия HeLa.

Приборы и реактивы:

Ламинарный бокс, пластиковая посуда, полная культуральная среда DMEM/F-12 с сывороткой и антибиотиком (Sigma), раствор трипсина, раствор Версена, автоматические микропипетки (1000, 200 и 10 мкл).

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Простерилизовать ламинарный шкаф в течение 40-60 мин. Перед началом работы выключить ультрафиолетовую лампу и включить в ламинарном шкафу осветительную лампу. Проверить наличие в шкафу стерильных пипеток, пинцетов, штативов, культуральных флаконов и другой необходимой культуральной посуды.
- 2) Надеть резиновые перчатки и обработать их 70% раствором этилового спирта.
- 3) В ламинарный шкаф внести, предварительно обработав 70% раствором этилового спирта, флаконы с соответствующими культуральными средами.

Важно! Обработке 70% раствором этилового спирта подвергать в дальнейшем любую посуду, инвентарь, а также перчатки работающего при внесении извне в ламинарный шкаф!

- 4) Криопробирку с замороженными клетками извлечь из криохранилища и перенести в емкость, заполненную предварительно нагретой до температуры культивирования водой (до 37°C для большинства клеточных линий или до 25°C для культивируемых клеток холоднокровных животных)
- 5) После размораживания суспензии клеток в ламинарном шкафу протереть криопробирку спиртом, высушить, вскрыть и перенести стерильной микропипеткой содержимое криопробирки в культуральный флакон, заполненный соответствующей средой с добавлением 20% сыворотки.
- 6) Перенести суспензию размороженных клеток в CO₂-инкубатор или термостат.
- 7) Спустя 4-6 часов с помощью инвертированного микроскопа оценить количество и степень расплывчатостисевших на дно культурального флакона клеток. При удовлетворительных результатах в ламинарном шкафу слить культуральную среду из флакона и заменить ее на среду, с 10% содержанием сыворотки.
- 8) Перенести культуральный флакон с размороженными клетками в CO₂-инкубатор или термостат для дальнейшего культивирования.

Глава 3. Прижизненные исследования клеток.

1. Теоретическая часть.

В широком смысле слова, прижизненные исследования – это изучение любых параметров, любых функций *живых* клеток. Прижизненными исследованиями могут быть как наблюдения за изменением морфологических характеристик клеток с помощью микроскопа, так и измерение каких-либо клеточных параметров методами количественного анализа (например, измерение интенсивности дыхания клеток или исследование секреции гормонов по динамике изменения концентрации в питательной среде кислорода или гормона, соответственно). Однако, в более узком смысле слова, в клеточной биологии под «прижизненным исследованием» понимают наблюдение живых клеток в микроскоп. В 19 веке, когда была сформулирована клеточная теория, и началось активное изучение строения клеток, наблюдение в микроскоп было единственным доступным методом изучения их жизнедеятельности. Именно этим методом была исследована морфология клетки и составляющих ее основных органелл, и показана роль большинства органелл, включая клеточное ядро. В те времена клетки еще не фотографировали, а рисовали. Исследователь в процессе рисования рассматривал объект в различных оптических плоскостях, поэтому рисунки старых авторов оказываются часто более информативными, чем фотографии тех же объектов, сделанные сто лет спустя. Поскольку процесс фотографирования, в отличие от рисования, не требует понимания морфологии изучаемого объекта, рисование микроскопических объектов до сих пор остается одним из наиболее эффективных приемов обучения, как в биологии, так и в медицине.

Первоначально объектами изучения биологов-микроскопистов были мелкие свободно живущие одноклеточные организмы, такие как, например, жгутиковые инфузории или амебы (**Рис.1а**), а также индивидуальные клетки многоклеточных организмов – сперматозоиды, яйцеклетки, клетки крови (**Рис. 1б**). Такие клетки (хотя и относительно непродолжительное время) можно было прижизненно наблюдать без создания специальных условий для поддержания их нормальной жизнедеятельности. Позднее биологи научились отделять клетки многоклеточных организмов друг от друга, не повреждая их, и ввели в практику исследований методы культивирования

клеток. Внедрение метода клеточных культур стало решающим событием в развитии метода прижизненных наблюдений (**Рис. 1в**).



Рис. 1. Прижизненное наблюдение различных биологических объектов: а) амеба; б) сперматозоид на поверхности яйцеклетки; в) клетки культуры ткани.

В **Главе 2** подробно изложены условия культивирования клеток *in vitro*. Понятно, что для цитофизиологических исследований удобнее использовать перевивные клеточные культуры. Чаще всего живые нативные клетки наблюдают с помощью метода фазового контраста (**Рис. 2а**), либо интерференционного контраста (**Рис. 2б**), а живые клетки с включенной флуоресцентной меткой наблюдают с помощью флуоресцентного микроскопа (**Рис. 2в**).

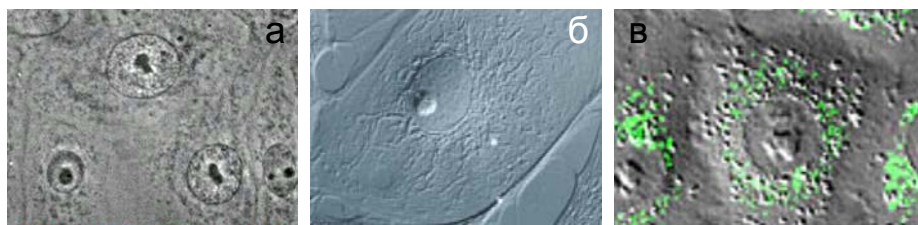


Рис. 2. Различные методы наблюдения живых клеток: а) фазовый контраст; б) дифференциальный интерференционный контраст (DIC); в) дифференциальный интерференционный контраст, совмещенный с наблюдением флуоресценции.

Изображения клеток регистрируют с помощью фото- или видеокамеры. Анализ изображений проводят в реальном времени или по окончании эксперимента.

Особенности условий культивирования клеток при прижизненных наблюдениях.

В целом, условия культивирования клеток в прижизненных исследованиях сходны с условиями их культивирования в термостате, но имеются и специфические особенности, связанные с тем, что клетки периодически необходимо фотографировать. Можно отметить несколько принципиальных условий, соблюдение которых необходимо для прижизненных наблюдений: поддержание постоянной оптимальной для клеток данного типа температуры, поддержание газового состава атмосферы, поддержание оптимальной кислотности и осмотичности среды культивирования, предохранение среды культивирования от высыхания, сохранение стерильности, защита клеток от переосвещения и вибрации. Далее будут последовательно рассмотрены технические приспособления, позволяющие культивировать клетки и осуществлять прижизненные наблюдения за ними.

Поддержание постоянной температуры.

Большинство клеток теплокровных животных требуют поддержания температуры около 37° С. Длительное снижение температуры на несколько градусов приводит к нарушениям митотического деления и, в конечном счете, к гибели клеток. Нагревание клеток выше 39° С приводит к тепловому шоку. Клетки холоднокровных животных значительно более устойчивы к охлаждению - например, митозы в них могут протекать при 9° С. Однако нагревание таких клеток выше 30° С приводит к остановке деления и гибели клеток.

При культивировании клеток в термостате постоянная температура за счет термоэлементов поддерживается во всем его объеме. Однако при переносе клеток на столик микроскопа достижение равномерного нагрева камеры с клетками существенно затрудняется необходимостью производить экспериментальные манипуляции.

Одним из решений является использование специальных воздушных фенов (**Рис. 3**), оборудованных термопарой, осуществляющей обратную связь между температурой нагрева воздуха и температурой столика микроскопа. Термопара может

быть закреплена непосредственно на выходном отверстии фена или на столике микроскопа. В любом случае, до того как экспериментальные клетки окажутся на столике микроскопа, расстояние до фена и уровень нагрева воздуха должны быть тщательно откалиброваны.



Рис. 3. Современный инвертированный световой микроскоп, оборудованный специальным воздушным феном для поддержания постоянной температуры на столике.

Другим вариантом контроля температуры и поддержания ее на нужном уровне является использование термостатируемых столиков микроскопа. Поскольку наблюдение клеток на больших увеличениях осуществляется с помощью иммерсионных объективов, контакт объектива со стеклом приводит к существенному оттоку тепла именно вблизи клеток, расположенных в зоне наблюдения. Поэтому сами объективы часто снабжают дополнительными термоэлементами (Рис. 4).



Рис. 4. Различные типы термоэлементов для поддержания и контроля температуры объективов светового микроскопа.

Микроскопы, предназначенные для длительных прижизненных наблюдений за клетками, могут быть оборудованы специальным прозрачным кожухом, внутри которого поддерживается как постоянная температура, так и необходимая влажность и газовый состав атмосферы (Рис. 5а).



Рис. 5. Современный микроскопический комплекс для прижизненных наблюдений. а) общий вид комплекса, в состав которого входит микроскоп, антивибрационный оптический стол и защитный кожух с системой подачи газа; б) и в) пневматические антивибрационные прокладки различной конструкции.

Поддержание стерильности.

Принципиальное значение при прижизненных исследованиях имеет поддержание стерильности среды культивирования клеток. Клетки можно наблюдать, как непосредственно в чашках Петри или специальных многолуночных «плашках» (**Рис. 6 а, б**), в которых они культивировались в термостате, так и в специальных камерах для прижизненных исследований. Для получения высококачественного изображения клеток в дне чашки Петри делается окно, закрытое тонким покровным стеклом (**Рис. 6в**).

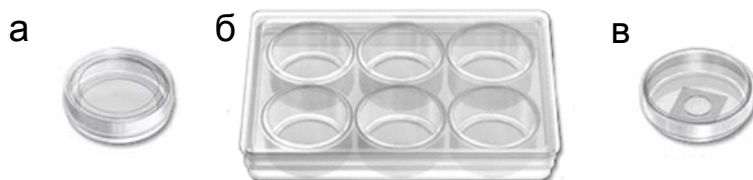


Рис. 6. *Различные культуральные чашки, пригодные для простейших прижизненных наблюдений: а) чашка Петри; б) шестилуночная плашка; в) чашка Петри со стеклянным «окном» на дне.*

При таком методе наблюдения используется инвертированный микроскоп, в котором объектив располагается под объектом. Большое распространение получили также специально сконструированные для прижизненных наблюдений многоразовые перфузионные камеры (**Рис. 7**).

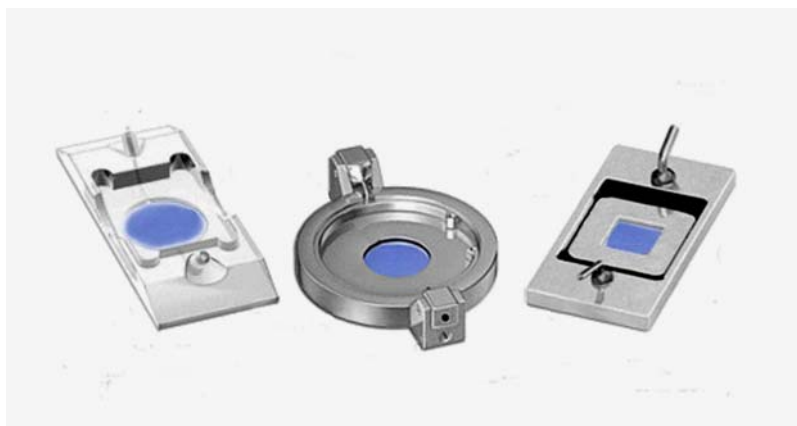


Рис. 7. Специальные многоразовые перфузионные камеры для прижизненных наблюдений

Однако, в последнее время на смену многоразовым камерам пришли одноразовые камеры различной конструкции (**Рис. 8**).



Рис. 8. Специальные одноразовые камеры для прижизненных наблюдений

Сборка камер осуществляется в стерильных условиях, в дальнейшем в закрытом виде камеры позволяют сохранять стерильность среды культивирования длительное время. Для контроля pH используют среду с добавлением красителя фенолового красного, который изменяет цвет на желтый при закислении среды и приобретает фиолетовый оттенок, если среда защелачивается.

Нарушение стерильности при наблюдении клеток в ходе прижизненных исследований приводит к существенному изменению состава и состояния среды культивирования. Иногда на ранних стадиях «пророста» (термин, используемый для обозначения ситуации, когда в среде начинает расти что-либо еще, кроме наблюдаемых клеток) бактерии, дрожжи или гифы грибов можно наблюдать в микроскоп в то время, когда цвет среды еще остается нормальным (**Рис. 9**). Полученные в условиях нарушения стерильности экспериментальные результаты должны быть исключены из массива данных, используемых для дальнейшего анализа.

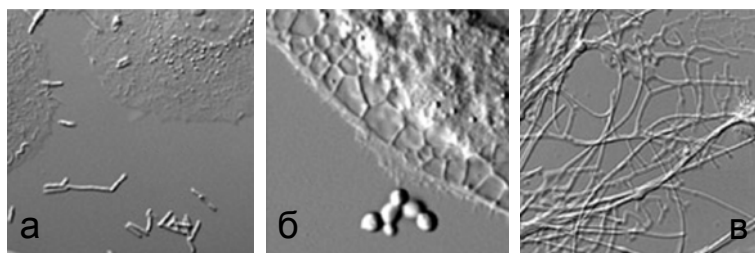


Рис. 9. *Различные типы «проростов»: а) бактериальный; б) дрожжевой; в) грибковый.*

Нарушения нормальной жизнедеятельности клеток можно наблюдать по характерным морфологическим признакам. В частности, наличие большого количества многоядерных клеток (**Рис. 10 а**) свидетельствует о дефектах митоза или цитокинеза, образование внутри клетки многочисленных вакуолей может быть результатом нарушения внутриклеточного транспорта (**Рис. 10б**), формирование по краю клетки небольших ламелл (blebbing) и «вскипание» цитоплазмы свидетельствуют о начале некроза (**Рис. 10 в, г**).

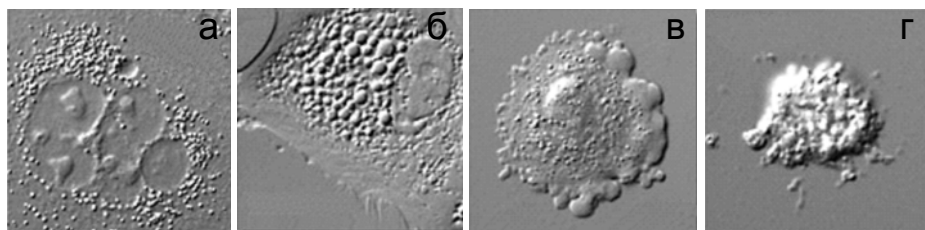


Рис. 10. Морфологические особенности, характеризующие нарушения нормальной жизнедеятельности клеток: а) многоядерные клетки; б) вакуоли в цитоплазме клеток; в) образование на краю клетки ламелл; г) «вскипание» цитоплазмы.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа: прижизненные наблюдения в фазово-контрастный микроскоп митотического деления и перехода в интерфазу в клетках линии XL2.

Цель работы: овладение навыками прижизненного наблюдения клеток.

Объект исследования: клетки линии XL2 (эпителиоидная перевивная линия, полученная из головастиков шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*).

Приборы и реактивы: микроскоп инвертированный, оснащенный оптической системой для наблюдения клеток методом фазового контраста; камера для прижизненных исследований, культуральная среда L15, эмбриональная сыворотка, антибиотик-антимикотик, стерильная пластиковая посуда для культивирования клеток, стерильные пипетки, спирт этиловый.

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) В стерильных условиях смонтировать камеру для прижизненных исследований.
- 2) Поместить камеру в пенопластовую коробку для переноски (лучше накануне вечером поставить в открытом виде эту коробку в термостат).
- 3) Включить микроскоп и поместить камеру с клетками на его предметный столик.

4) Сфокусировать микроскоп и найти клетку в профазе. В этой клетке хромосомы должны быть уже конденсированы, но при этом должна быть четко видна ядерная мембрана.

5) Наблюдать прохождение этой клеткой всех последующих стадий деления, включая переход в постмитотическую интерфазу, с обязательной регистрацией изображений (см. описание ниже).

Описание митоза в клетках XL2 (обязательные наблюдения, которые необходимо сделать в ходе выполнения задачи).

На рисунке 11 показаны последовательные фотографии клетки линии XL2 шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) в митозе и в процессе перехода от митоза к интерфазе. Точкой отсчета временной шкалы является момент съемки первого кадра серии (точка 0' на рис. 11а).

На первой фотографии клетка находится в ранней **профазе**. Четкую границу между завершающим интерфазу G2-периодом клеточного цикла и профазой провести трудно, однако принято считать, что с началом профазы становятся хорошо заметными конденсированные хромосомы (фото 11а, **ХР**). Хромосомы погружены в кариоплазму, имеющую более светлый оттенок, чем окружающая ядро цитоплазма (следует помнить, что понятия «светлый» и «темный» при наблюдении в фазовом контрасте не являются отражением реальной интенсивности окраски клеток, это лишь условные характеристики, используемые для удобства описания). На рис. 11а и 11б также хорошо видна ядерная мембрана, разделяющая кариоплазму и цитоплазму (**ЯМ**). Светлые «пузыри», собранные в две группы в верхней и нижней области клетки, являются, по-видимому, жировыми каплями. По правому краю клетки видны расходящиеся **то нее** «нити» – это участки цитоплазмы, связанные фокальными контактами с подложкой, на которой культивируются клетки. В процессе митоза клетка постепенно изменяет свою форму от уплощенной, характерной для интерфазы, на «ошареную», подготавливаясь, таким образом, к процессу деления цитоплазмы, называемому цитокинезом.

Через 5 мин после начала наблюдения ядерная мембрана быстро исчезает и цитоплазма смешивается с периферической частью кариоплазмы (фото 11в). Профаза переходит в **прометафазу**, в которой конденсированные хромосомы беспорядочно разбросаны в центральной части клетки, при этом «ошаривание» клетки

прогрессирует (фото 11в и 11г). Постепенно положение хромосом все более упорядочивается, они собираются в экваториальной части клетки, формируя так называемую метафазную пластинку (**МП**) – таким образом, клетка переходит от прометафазы к **метафазе** (фото 11д, е, ж). По времени, граница перехода от прометафазы к метафазе не настолько четко выражена, как от профазы к прометафазе. Обычно считается, что клетка перешла в метафазу, когда последняя хромосома встроилась в метафазную пластинку. При этом центромерные участки хромосом лежат по экватору, а плечи хромосом ориентированы в обе стороны от него. Сверху и снизу от метафазной пластинки видны участки клетки, имеющие форму, близкую к треугольной, в которых не обнаруживается гранул – это два полуверетена веретена деления (**ВД**), в полюсах которых расположены centrosомы, состоящие из двух центриолей каждая. Хромосомы в составе метафазной пластинки постоянно перемещаются, то несколько приближаясь к полюсам веретена, то возвращаясь в метафазную пластинку. Этот процесс называется *конгрессией хромосом*, он является отражением динамического характера поддержания положения хромосом в составе метафазной пластинки. Метафаза в большинстве типов клеток является наиболее продолжительной стадией митоза. Несмотря на кажущуюся неизменность морфологии клетки в ходе метафазы, в ней в это время происходят многочисленные биохимические перестройки, являющие собой завершающие стадии подготовки к образованию двух дочерних клеток. В частности, в клетке происходит корректировка сопряжения клеточного и центриольного циклов.

В конце метафазы хромосомная пластинка еще более уплотняется (фото 11ж) и через минуту две группы хроматид, разделившись, начинают свое движение в полюсам веретена (фото 11з) – метафаза переходит в **анафазу**. На этой стадии различают два типа перемещений. С одной стороны, хромосомы движутся к полюсам веретена; с другой стороны, сами полюса веретена расходятся друг от друга. Первый процесс называется *анафазой А*, второй – *анафазой Б*. Анафаза Б обычно начинается спустя несколько минут после начала анафазы А. В процессе перемещения хромосом их центромерные участки движутся впереди, а плечи хромосом «отстают» (фото 11и, к). На хорошо распластанных клетках видны гомологичные хромосомы, имеющие одинаковую форму. Иногда плечи гомологичных хромосом не сразу полностью

разделяются, тогда в микроскоп видны фигуры, получившие название хромосомных мостов (фото 11л, **ХМ**).

Анафаза – самая скоротечная стадия митоза, уже через 6-8 минут движение хромосом прекращается и они располагаются в двух концах клетки в виде «розеток», анафаза переходит в **телофазу** (фото 11м). Одновременно или чуть раньше либо позднее начинается процесс цитокинеза (цитотомии). Если на фото 11м левый край клетки в экваториальной части клетки абсолютно прямолинеен, что уже через минуту заметно, что клеточная мембрана начинает стягиваться формирующейся перетяжкой (фото 11н, **ПТ**). Одновременно с формированием перетяжки хромосомы постепенно деконденсируются и плечи отдельных хромосом перестают различаться (фото 11н, о, п). В норме перетяжка делит цитоплазму ровно пополам между дочерними клетками. Однако иногда, особенно у хорошо распластанных и прикрепленных к субстрату клеток, случаются нарушения цитотомии, в этом случае в дополнение к двум клеткам могут образовываться отделенные от клеток участки цитоплазмы без хромосом – цитопласты (фото 11п-ц, **ЦП**), которые позднее обычно сливаются с одной из дочерних клеток. После того, как перетяжка разделяет цитоплазмы дочерних клеток, митоз заканчивается, и клетка переходит в **G1-фазу клеточного цикла**. В районе между дочерними клетками образуется структура, получившая название остаточного тельца (**ОТ**), которое часто видно в микроскоп на протяжении нескольких часов после завершения митоза (фото 11р-ч). Хромосомы постепенно декомпактизуются и вокруг них образуется ядерная мембрана (фото 11т, нижняя клетка, **ЯМ**). Сначала хромосомы теряют форму розетки и в ядре видны лишь глыбки хроматина. Позднее кариоплазма становится все более свободной от хроматина, и одновременно становится заметно формирующееся ядрышко (фото 11ч).

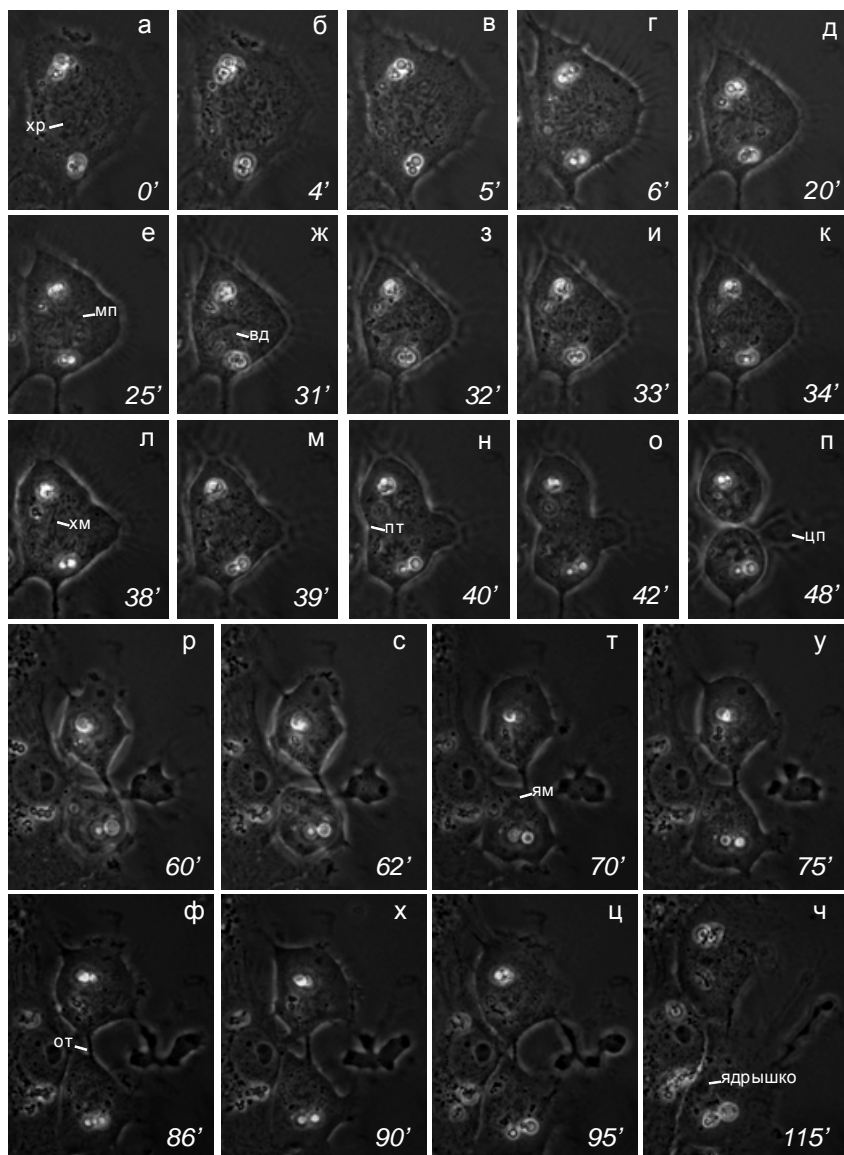


Рис. 11. Прижизненное наблюдение клеток линии XL2 от стадии профазы митоза до ранней G1-фазы интерфазы. Пояснения в тексте.

Глава 4. Гистохимическая окраска препаратов для световой микроскопии

1. Теоретическая часть.

Гистохимические методы.

Общая задача гистохимии — выяснение особенностей химического состава, а также обмена веществ в составляющих ткани клетках и межклеточном веществе. Гистохимия изучает также разнообразные изменения этих характеристик в самых разных аспектах жизнедеятельности клеток и тканей, например, в процессе развития тканей. В основе гистохимических методик лежит свойство определённых химических компонента клеток связываться с красителем или образовывать окраску в процессе реакции. В настоящее время накоплено огромное количество разнообразных классических гистохимических методик, часто носящих имя имена их авторов (реакция Фельгена на ДНК, метод Шабадаша для выявления гликогена, метод Дадди для выявления нейтрального жира).

С помощью современных гистохимических методов можно с высокой точностью определить локализацию многих веществ в ткани, оценить их количество, изучить активность многочисленных ферментов, исследовать их связь с субмикроскопической структурой (электронная гистохимия). Часть гистохимии, которая основана на возможности выявлять тот или иной тканевой или клеточный компонент благодаря связыванию его с мечеными антителами, в настоящее время развилась в самостоятельный методический подход - иммуногистохимию (применительно к отдельным клеткам - иммуноцитохимию), и будет рассмотрена в отдельной главе.

Принцип метода.

Для того, чтобы исследовать клетки, используя просвечивающий световой микроскоп, необходимо создать достаточный контраст между разными компонентами клеток и тканей. Для этого в гистохимии используют окрашивание разными типами красителей. Увеличение контрастности между отдельными частями клеток и тканей происходит за счет двух основных процессов. Во-первых, когда какой-либо компонент связывает большее количество красителя, чем окружающие его другие

компоненты, оптическая плотность его возрастает, снижая амплитуду проходящих сквозь него световых волн. При этом такой компонент кажется темнее, чем окружающие его, связавшие меньше красителя. Во-вторых, адсорбированный краситель изменяет длину волны света, прошедшего через соответствующий компонент, который приобретает соответствующую окраску.

Подготовка материала для гистохимического исследования.

Существуют гистохимические методы, которые позволяют наблюдать окрашивание в живых клетках. При этом краситель может быть введен в организм животного и далее выявлен в процессе исследования его тканей (например, трипановый синий прижизненно накапливается и потом выявляется в фагоцитах, а ализарин в новообразованном матриксе костей) или добавлен к клеткам, выделенным из тканей, или культивируемых *in vitro* (например, краситель акридиновый оранжевый прижизненно окрашивает ядра клеток, краситель зеленый янус – митохондрии, краситель нейтральный красный - лизосомы).

Однако, чаще всего, для проведения гистохимических реакций требуется предварительная обработка тканей (фиксация и гистологическая «проводка» материала), от качества которой напрямую зависят результаты исследований.

Различают несколько типов гистологических препаратов: мазок (например, крови, спинномозговой жидкости или костного мозга), отпечаток ткани (например, печени, селезенки), пленки (таким образом исследуют, предварительно растянув, пленки брюшины или мозговых оболочек), давленный препарат (его используют при исследовании тканей растений), и наиболее часто используемые препараты - срезы тканей и клеток.

Для приготовления препарата, который можно наблюдать в микроскоп, необходимо обработать ткань фиксатором – веществом или смесью веществ, которые должны быстро остановить все метаболические процессы в ткани, то есть сохранить клетки и межклеточное вещество в максимально нативном состоянии. Основные требования, предъявляемые к фиксации клеток и тканей следующие: клетки должны быть зафиксированы быстро для предотвращения процессов автолиза и гетеролиза; фиксирующее вещество должно в максимальной степени сохранять прижизненную структуру клеток, осадить и связывать имеющиеся в клетке вещества и структуры, сделав их недоступными для извлечения и разрушения при последующих обработках,



Рис. 1. Схема изготовления гистологических срезов с помощью микротомы. Залитый в парафин образец закрепляется в держателе на подвижном рычаге микротомы. Образующие ленту последовательные срезы остаются на лезвии ультратомы, откуда их перемещают на предметное стекло и подвергают дальнейшей обработке.

повышать способность структур воспринимать гистологические красители, усилить разницу в показателях преломления клеточных компонентов. В соответствии с задачами конкретного исследования, подбирается наиболее адекватный экспериментальной задаче способ фиксации. Широкое применение имеют фиксаторы на основе альдегидов (формальдегида и глутарового альдегида), которые формируют ковалентные связи со свободными аминогруппами белков, сшивая соседние

молекулы. В качестве фиксаторов могут быть использованы этиловый и метиловый спирты, уксусная кислота и ее смеси с этиловым спиртом и формалином в разных соотношениях, ацетон, а также разнообразные сложные смеси на основе хромовой кислоты, двуххромовокислого калия, сулемы и т.д. Многие фиксирующие смеси носят названия исследователей, впервые их применивших – фиксатор Бродского (формалин, 96% этиловый спирт, ледяная уксусная кислота), фиксатор Шабадаша (96% этиловый спирт, азотнокислая медь, азотнокислый кальций, формалин), фиксатор Карнуа (96% этиловый спирт, хлороформ, ледяная уксусная кислота).

В некоторых случаях для фиксации приходится использовать вещества (различные смеси, в состав которых входят спирты и кислоты), заведомо сильно повреждающие клетки – экстрагирующие часть клеточных компонентов. Их применение оправдано тем, что такая частичная экстракция позволяет выявить структуру интересующих исследователя компонентов, не выявляемую при обычных способах фиксации. Интерпретировать данные таких экспериментов следует с особой осторожностью, сделав максимальное количество необходимых контрольных препаратов.

Если необходимо исследовать достаточно тонкие объекты - мазки, отпечатки ткани, а также клетки, растущие на стекле в виде монослоя, то такие препараты можно окрашивать сразу после фиксации. Для того, чтобы иметь возможность исследовать под световым микроскопом ткань, необходимо сделать ее гистологические срезы. Зафиксированные образцы следует порезать на срезы толщиной от 3 до 10 мкм. Поскольку биологические ткани имеют неплотную структуру, для изготовления срезов их необходимо заключить в плотную заливочную среду. При гистологическом исследовании для этой цели чаще всего используют парафин. Предназначенный для исследования зафиксированный фрагмент ткани после обезвоживания помещают в расплавленный парафин, которым в течение длительного времени пропитывают ткань при температуре 60°C. После охлаждения получается твердый образец, который можно использовать для изготовления гистологических срезов.

Предложенный способ достаточно трудоемок и требует больших временных затрат. В большой степени это обусловлено тем, что парафин не растворим в воде. Перед погружением в парафин образцы, как уже было отмечено, необходимо

обезвоживать, например, в этиловом спирте. Для того, чтобы предотвратить резкое сжимание ткани при обезвоживании, используют последовательную обработку образцов в серии этиловых спиртов повышающейся концентрации (50°, 70°, 80°, 96°). Затем образец переносят в толуол или ксилол (в которых парафин хорошо растворяется), затем в смесь толуола и парафина и только после этого его переносят в чистый парафин.

Для изготовления гистологических срезов из залитого в парафин образца используют специальные приборы – микротомы (**Рис. 1**). Изготовленные на микротоме срезы (обычно, их толщина составляет 4-6 мкм) переносят на предметное стекло и закрепляют. Поскольку большинство гистохимических красителей растворимы в воде, для того, чтобы окрасить смонтированные на стекле срезы, необходимо удалить парафин, растворив его в толуоле, а затем регидратировать срезы в спиртах понижающейся концентрации. После регидратации препарат готов к окрашиванию выбранным гистологическим красителем.

В настоящее время, кроме парафиновых срезов также широко используют криосрезы, которые готовят из замороженных кусочков ткани. Ткань сразу после фиксации пропитывается специальной смесью, предотвращающей образование при заморозке крупных кристаллов льда, которые могут повредить клетки. Преимущество такого способа изготовления срезов состоит в скорости их приготовления (суммарное время приготовления препарата – десятки минут) и в большей сохранности тканей, которые не подвергались процессам дегидратации-регидратации и нагревания. Иногда криосрезы могут изготавливаться и из нефиксированных образцов, в этом случае быстрая заморозка сама по себе играет роль первичного фиксатора, а окончательная фиксация проводится уже на срезах. Для изготовления криосрезов используют криостаты – специальные микротомы, установленные в охлажденной до низких температур (от -20°C до -35°C) камере. Наиболее широкое применение криосрезы получили в медицинской практике - быстрота приготовления препаратов достаточна для анализа биопсийного материала прямо во время хирургической операции, что позволяет корректировать ее проведение.

Естественно, качество получаемых препаратов в этом случае намного ниже, чем при использовании парафиновых срезов. Однако, то что ткань в ходе изготовления криосрезов не подвергается действию высоких температур, приводящих к

денатурации белков (как уже указывалось, температура плавления парафина +60°C), дает возможность использовать криосрезы для выявления белков с использованием специфических антител. Это преимущество делает криосрезы востребованным инструментом в современной гистологии.

После окрашивания препарат должен быть заключен под покровное стекло в заливочную среду (канадский бальзам, DePex), для чего его необходимо заново дегидратировать в спиртах повышающейся концентрации и в толуоле. Заключение в среду обеспечивает, в одной стороны, сохранность препарата, а с другой – обеспечивает его прозрачность, поскольку готовый образец должен иметь коэффициент преломления, близкий к коэффициенту преломления стекла. Возможно также заключение гистологического препарата в водорастворимые заливочные среды (Mowiol или Elvanol), в таком случае их дегидратация не нужна.

Таким образом, изготовление постоянного гистологического препарата включает в себя следующие этапы: фиксацию клеток или тканей, их обезвоживание, заливку в парафин или иную пластичную среду, изготовление срезов, монтаж срезов на предметном стекле, удаление парафина из срезов, их окрашивание, обезвоживание и, наконец, заключение в заливочную среду.

Красители, используемые в гистохимии.

В гистохимии *базофильей* называется средство к основному красителю, а *ацидофильей* – средство к кислому красителю. Окрашивание тканевых компонентов основными или кислыми красителями зависит от наличия у них достаточного количества заряженных групп, способных связывать красящие группы, несущие противоположные заряды. Так, у базофильных компонентов имеется достаточное количество анионных (отрицательных) зарядов, а у ацидофильных компонентов – достаточное количество катионных (положительных) зарядов.

Соответственно, все красители, используемые в гистохимии, можно разделить на две основные группы – *основные* и *кислые*. Основные красители связываются при окрашивании с кислотами (например, с ДНК и РНК); структуры хорошо окрашивающиеся основными красителями называются *базофильными*. Кислые красители взаимодействуют с основаниями; структуры хорошо окрашивающиеся кислыми красителями называются *оксифильными* (например, гемоглобин). Также в клетках могут присутствовать структуры, окрашивающиеся как

кислыми, так и основными красителями; такие структуры называют нейтрофильными или гетерофильными (например гранулы в цитоплазме клеток крови – нейтрофилов). Основные и кислые красители часто представляют собой нейтральные соли, и каждая из них содержит как кислую, так и щелочную группу. Но у основных красителей красящими свойствами обладает основная группа, а у кислых – кислотная. В зависимости от задачи, основные и кислые красители могут использоваться как раздельно, так и одновременно.

Всякая окраска начинается как физический процесс, при котором находящийся в растворе краситель проникает в более грубые и более тонкие тканевые поры, где распределяется и накапливается в соответствии с физическими законами капиллярности и поверхностного натяжения. Эта фаза продолжается в течение нескольких минут. Вторая фаза – собственно окраска – взаимодействие биологических структур с красителем представляет собой чисто химический процесс. На третьей стадии, во время дифференцировки, можно с помощью более сильного растворителя модифицировать получившиеся химические соединения.

Наиболее распространенными на сегодняшний день гистохимическими красителями являются приготовленные по различным рецептам гематоксилины (квасцовый гематоксалин Караччи, квасцовый гематоксалин Бемера, железный гематоксалин Гейденгайна) и смеси красителей (гематоксалин-эозин, азури-эозин, смесь Романовского-Гимза (метиленовый синий-эозин)). В зависимости от протокола приготовления гематоксалин позволяет получить окраску разного цвета. Гематоксалины Караччи и Бемера окрашивают кислые компоненты клетки в сине-фиолетовый цвет, а железный гематоксалин Гейденгайна – в черный цвет. Эозин – синтетический краситель, окрашивающий щелочные компоненты клетки в розовый или оранжевый цвет.

2. Экспериментальная часть.

В задачу настоящего практикума входит окрашивание гематоксилином ядер интерфазных и хромосом митотических культивируемых клеток HeLa. Гематоксалин (его химическая формула приведена на рис.2 – краситель растительного происхождения ($C_{16}H_{14}O_6 \cdot 3H_2O$ М.м. 356,33), содержится в форме гликозида в соке кампешового дерева (*Haematoxylon campechianum*), произрастающего в Индии и

Америке. Родиной этого дерева является южная Мексика, область Кампече. Выделяют гематоксилин путем экстракции диэтиловым эфиром.

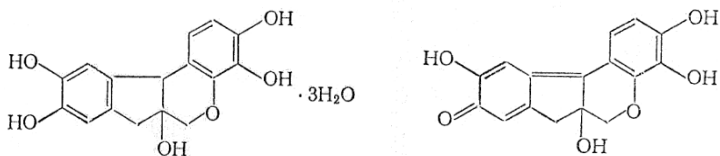


Рис.2. Гематоксилин (слева) и гематеин (справа).

Гематоксилин сам по себе красителем не является, однако, окисляясь, превращается в сильноокрашающий гематеин (**Рис. 2, справа**) – собственно, все рецепты приготовления гематоксилина для окрашивания препаратов имеют своей целью превращение гематоксилина в гематеин. Ни сам гематоксилин, ни гематеин не способны давать окрашивание без протрав, с которыми они образуют солеобразные соединения – лаки. В качестве протрав используют соли алюминия, железа, меди, хрома, молибдена, ванадия.

Таким образом, приготовление такого красителя, как гематоксилин – процесс длительный. Красящие растворы, приготовленные из гематоксилина, приобретают способность к окрашиванию лишь через некоторое время, они должны “созреть”. Под “созреванием” как раз и понимают процесс превращения гематоксилина в гематеин, происходящий в результате окисления гематоксилина. Прибавляя к растворам сильные окислители (йодноватистый калий, перманганат калия, перекись водорода), этот процесс можно значительно ускорить. Без добавления окислителей приготовленные растворы гематоксилина должны “созревать” в течение 3-4 недель на свету и с доступом кислорода воздуха, для чего раствор с красителем оставляют на подоконнике, накрыв марлей. При использовании искусственного (ускоренного) созревания необходимо учитывать, что с увеличением количества окислителя понижается устойчивость раствора гематоксилина при длительном хранении, а при переокислении образуются высшие степени окисления, так называемые оксигематеины, которые переходят в грязно-коричневые продукты, не обладающие красящими свойствами.

Гематоксилин представляет собой краситель, имеющий слабый отрицательный заряд. При переходе в продукты окисления, гематеин и оксигематеин, отрицательный заряд возрастает. При образовании лака под влиянием таких электролитов, как железные или калийные квасцы, происходит сильная положительная перезарядка красителя. Железные и квасцовые лаки, имеющие сильный положительный заряд, красят прогрессивно (т. е. интенсивность окрашивания увеличивается с увеличением времени инкубации с красителем).

Практическая работа: окрашивание культивируемых клеток HeLa гематоксилином.

Цель работы: овладение навыками окрашивания клеток гистологическими красителями.

Объект исследования: клетки HeLa.

Приборы и реактивы: культуральные клетки HeLa, растущие на покровном стекле, предметные стекла, PBS, растворы этилового спирта (50%, 70%, 80%, 96%, 100%), дистиллированная вода, гематоксилин, толуол, заливочная среда DePeX.

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Быстро промыть клетки в PBS и зафиксировать их в 70% этиловом спирте (30 минут при комнатной температуре). Для этого удаляют из чашек Петри культуральную среду, стекла в чашке Петри споласкивают буфером PBS, затем аккуратно удаляют буфер из чашки Петри и наливают в нее 70% этиловый спирт.
- 2) После завершения фиксации заменить этиловый спирт в чашке Петри на дистиллированную воду.
- 3) Окрашивание гематоксилином - в чашку Петри со стеклами налить 2 мл краски и окрашивать 3-5 мин. Оптимальное время окрашивания подбирают эмпирически.
- 4) Промыть клетки проточной водой, которая имеет слабо-щелочной pH. В таких условиях цвет гематоксилина меняется с красновато-коричневого на синий. Этот процесс необходимо контролировать визуально. Качество полученного препарата (цвет окрашенных гематоксилином структур, проработку деталей) следует проконтролировать, используя микроскоп.
- 5) Дегидратировать клетки в серии спиртов (50%, 70%, 80%, 96%, 100%). В каждом спирте проинкубировать клетки по 2 минуты. Перенести стекла с клетками в стеклянные или полиэтиленовые чашки.

- 6) Промыть стекла с клетками в толуоле.
- 7) Нанести на предметное стекло каплю среды DePeX, убрав излишек толуола фильтровальной бумагой, положить покровное стекло с клетками (клетками вниз!) на каплю DePeX.
- 8) После застывания среды, избыток DePeX удалить бритвой или скальпелем. Препарат можно хранить в темном месте при комнатной температуре в течение длительного времени, именно поэтому такой препарат называют постоянным.

1. Теоретическая часть.

Иммуноцитохимические методы.

Бурное развитие иммунологии привело к разработке принципиально нового метода исследования биохимического состава клеток — иммуноцитохимического анализа. Иммуноцитохимия — это метод выявления точной локализации того или иного клеточного компонента (антигена), благодаря связыванию его с мечеными антителами. Авторами этого метода считается группа исследователей под руководством Альберта Кунса, которые впервые в 1941г. получили меченые флуоресцеином антитела и применили их в диагностических целях. Этот метод впоследствии получил название "прямой метод Кунса", поскольку флуорохром или фермент были связаны непосредственно с антиген-специфичным антителом. Однако этот метод не получил распространения из-за большой сложности получения меченых специфических антител. Кроме того, прямой метод Кунса позволяет выявлять только антигены в относительно высокой концентрации, поскольку с одной молекулой антитела связывается только одна молекула флуорохрома.

Широкое применение иммуноцитохимических методов стало возможным после того, как для выявления антигенов стали использовать комбинацию из нескольких последовательно наносимых на клетки антител. В этом случае первые специфичные к исследуемому белку антитела не несли метки, и их выявляли после связывания со вторыми мечеными антителами, полученными к иммуноглобулинам первого животного. Этот метод, получивший название "непрямой метод Кунса", обладает существенно большей чувствительностью, поскольку с одной молекулой первых антител связывается несколько молекул вторых антител, что приводит к усилению сигнала. "Непрямой метод Кунса" лежит в основе большинства современных методик иммуноцитохимического анализа клеток, он является высокоспецифичным и высокочувствительным, и дает возможность выявить антигены в концентрации до 8 нанограммов на 1 мм².образца.

Современные иммуноцитохимические методы позволяют локализовать и идентифицировать антигены белков различных клеточных структур: рецепторов на

поверхности клетки, цитоскелета, онкогенов и генов-регуляторов апоптоза, клеточного ядра и т.д. Кроме того получены антитела, которые взаимодействуют с модифицированными нуклеотидами, например с бромдезоксисуридином, что позволяет выявлять сайты включения этого нуклеотида в ядра клеток для картирования паттернов репликации ДНК.

Структура иммуноглобулинов.

Антитела (иммуноглобулины) продуцируются клетками иммунной системы, прежде всего В-лимфоцитами, и являются одним из компонентов защиты организма от инфекционных агентов, токсинов и других чужеродных веществ. Иммуноглобулины располагаются в виде мембранных белков на поверхности лимфоцитов и присутствуют в свободном виде в плазме крови. Проникший в организм чужеродный антиген узнается клетками иммунной системы, что вызывает пролиферацию лимфоцитов, которые ответственны за продукцию антител, взаимодействующих с этим антигеном. Антитела взаимодействуют с определенным участком молекулы антигена, которая называется *эпитопом*. С одним и тем же антигеном могут специфически связываться несколько различных антител, взаимодействующих с разными эпитопами.

Иммуноглобулины (Ig) являются семейством Y-образных (по пространственной структуре) гликопротеинов, у которых обе вершины («буквы Y») могут связывать антиген. Молекула наиболее важного из них – иммуноглобулина класса G (IgG) - представляет собой крупный тетрамер (150 кДа) из двух идентичных тяжелых цепей (H-цепей) и двух идентичных легких цепей (L-цепей) (**Рис. 1**). В обеих H-цепях также имеется ковалентно связанный олигосахарид. Иммуноглобулины расщепляются протеиназой папаином на два F_{ab}-фрагмента и один F_c-фрагмент (**Рис. 1**). Оба F_{ab}-фрагмента (от англ. antigen binding fragment — антиген-связывающий фрагмент) состоят соответственно из одной целой L-цепи и N-концевой части H-цепи. Изолированные F_{ab}-фрагменты сохраняют способность связывать антиген, что позволяет использовать их для иммуноцитохимического анализа.

При обработке антител пепсином происходит расщепление молекулы иммуноглобулина на фрагменты F(ab')₂ и pFc' (**Рис. 1**). Использование для иммуноцитохимического окрашивания меченых флуорохромами F(ab')₂ фрагментов не приводит к существенному ослаблению сигнала, так как в обоих случаях – и с

одной молекулой целого иммуноглобулина, и с $F(ab')_2$ фрагментом – связывается несколько молекул флуорохрома. Преимущество использования $F(ab')_2$ фрагментов состоит в том, что некоторые типы клеток, в частности клетки лимфатической системы, содержат на своей поверхности Fc-рецепторы, связывание с которыми целых молекул антител повышает уровень неспецифического окрашивания..

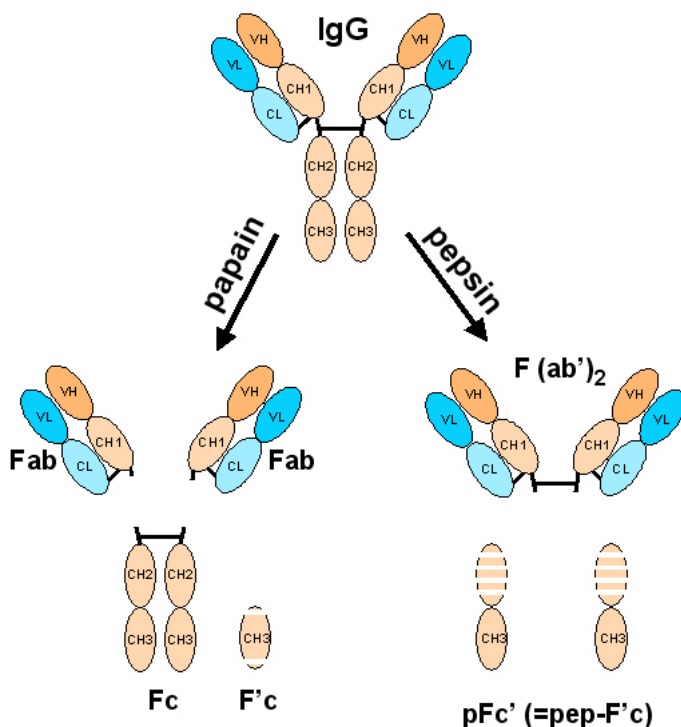


Рис. 1. Строение молекулы IgG и ее составных частей, получаемых при фрагментации IgG папаином или пепсином и используемых при иммуноцитохимических окрашиваниях. Условные обозначения: VL – переменная часть легкой цепи, CL – консервативная часть легкой цепи, VH – переменная часть тяжелой цепи, CH1, CH2, CH3 – консервативные части тяжелой цепи.

Предварительное удаление Fc-участков иммуноглобулинов позволяет отчасти решить эту проблему. В качестве вторых антител также используют Fab-фрагменты. Недостаток их применения состоит в том, что в отличие от целых иммуноглобулинов и от F(ab')₂-фрагментов, Fab-фрагменты имеют только один антиген-связывающий участок, следовательно прочность его связывания может оказаться пониженной. Тем не менее, конъюгаты на основе Fab-фрагментов широко используют при выявлении антигенов на ультраструктурном уровне, поскольку их меньший размер, по сравнению с целыми молекулами антител, способствует лучшему проникновению внутрь клеток. Fc-Фрагмент (от англ. fragment crystallizable — способный кристаллизоваться) состоит из C-концевой половины обеих H-цепей (**Рис. 1**). Эта часть IgG выполняет функции связывания с клеточной поверхностью, взаимодействия с системой комплемента и участвует в переносе антител.

Моноклональные и поликлональные антитела.

Антитела получают путем иммунизации животных соответствующими антигенами. В лабораторных условиях в качестве животных для иммунизации используют мышей, морских свинок, кроликов. На специализированных предприятиях по получению антител используют более крупных животных: овец, коз, лошадей. Также возможно использовать для получения антител птиц, в частности кур: антитела после иммунизации выделяют из желтков яиц. Антигеном может служить как какая-либо клеточная фракция, так и очищенный белок или синтезированный пептид. Для характеристики антител введены понятия *аффинность* (аффинитет) и *авидность* (авидитет). Аффинность - это параметр, описывающий взаимодействие конкретной молекулы антитела с антигенной детерминантой. Авидность описывает силу кооперативных аффинных взаимодействий всех антител. Авидность зависит не только от суммы аффинностей, но и от количества связывающих центров и особенностей пространственной структуры антигена, которые могут создавать стерические препятствия для образования комплекса антиген-антитело. В поликлональной сыворотке авидность многократно возрастает за счет поливалентности большинства антигенов.

Иммунный ответ на введение одного антигена сопровождается синтезом

антител, различающихся по структуре и функциональному предназначению. Иммунная система организма устроена эшелонированно – существует несколько "линий защиты" от внедрения антигенов. Это иммуноглобулины классов G, D, E, A, M, из которых первые три могут связать по две молекулы антигена, то есть являются двувалентными; IgA четырех- или восьмивалентны, а IgM – десятивалентны. С учетом того, что антиген, используемый для иммунизации животного, содержит не одну, а несколько антигенных детерминант, можно представить, какое множество антител вырабатывается в организме на введение одного антигена. Антиген вводят животному вместе с неспецифическим стимулятором иммунного ответа – *адьювантом Фрейнда*, который стимулирует пролиферацию лимфоцитов. Для повышения концентрации антител в сыворотке крови иммунизацию проводят несколько раз. Вначале в организме животного происходит образование низкоаффинных антител, и только после повторной иммунизации, в течение 1-1,5 месяцев, в процессе созревания иммунного ответа, образуются высокоаффинные антитела, высокая концентрация которых сохраняется в организме длительное время. При таком способе антитела производят несколько клонов плазматических клеток, поэтому сыворотки и называются поликлональными.

Для очистки и стандартизации поликлональных антител используется аффинная хроматография. Сыворотка крови от иммунизированного животного пропускается через колонку с полисахаридными шариками с которыми ковалентно связан антиген. Специфические антитела связываются антигеном, а все другие белки, в том числе антитела с низким сродством к антигену проходят через колонку не задерживаясь. Вслед за этим, специфически связанные антитела смывают с колонки кислым или щелочным раствором: связь антигена с антителом нековалентна. Один цикл аффинной очистки позволяет повысить концентрацию специфических антител в сыворотке в 1000 раз и более. Следует отметить, что наиболее «ценные» антитела, обладающие максимальной аффинностью к антигену, смывать с колонки особенно трудно, поэтому наряду со значительным повышением специфичности, очищенные антитела могут, иногда, обладать более низкой авидностью.

Однако даже такой способ очистки не позволяет избавиться от гетерогенности антител в сыворотке. Чтобы этого добиться, необходимо получать антитела одной специфичности, реагирующие с единственной антигенной детерминантой. Такие

антитела называются моноклональными. Их получают методами клеточной инженерии, путем гибридизации иммунокомпетентных В-лимфоцитов и клеток миеломных опухолей, способных к быстрому размножению и неограниченному числу делений (в отличие от большинства неопухолевых клеток, у которых число делений ограничено). Препараты моноклональных антител характеризуются постоянством состава и физико-химических свойств, низкой вероятностью перекрестной реакции с "чужими" антигенами.

Для иммуноцитохимического анализа используют как поликлональные сыворотки, так и моноклональные антитела. Преимуществом использования моноклональных антител по сравнению с поликлональными сыворотками является более высокая специфичность к антигену. В то же время, присутствующие в поликлональной сыворотке, антитела к различным эпитопам антигена позволяют использовать более широкий диапазон методов фиксации, что принципиально важно для сохранения структур клетки, так как нарушение структуры одного из эпитопов не обязательно приводит к изменению остальных. Кроме того, при использовании поликлональных сывороток за счет присутствия антител к различным эпитопам чувствительность метода выявления исследуемого антигена выше, чем при использовании моноклональных антител.

Основные этапы иммуноцитохимии.

Пермеабиллизация.

Для того, чтобы молекулы антител могли связаться с внутриклеточными антигенами, мембрана клеток должна быть частично разрушена или перфорирована - должна быть проведена пермеабиллизация клеток.

В качестве пермеабилзирующих агентов используют различные неионные детергенты (NP-40, Nonidet P-40, Triton X-100, Brij-35, Tween-20, дигитонин). Два близких по химическому составу детергента, которые часто принимают за один – NP-40 (nonyl phenoxypolyethoxyethanol) и Nonidet P-40 (octyl phenoxypoly ethoxyethanol) – существенно повреждают клеточную мембрану и используются в концентрациях от 0,1 до 1 процента. Nonidet P-40 химически идентичен детергенту, выпускаемому под широко известной торговой маркой Triton X-100. Детергенты Brij-35 (polyoxyethylenglycol dodecyl ether), Tween-20 (Poly(oxyethylene)-sorbitane-

monolaurate) и дигитонин (и другие сапонины) считаются более "мягкими", то есть меньше повреждающими клеточные мембраны. В некоторых случаях, когда необходимо увеличить доступность антигена, клетки обрабатывают детергентом либо перед фиксацией, либо одновременно с ней. Иногда детергент (чаще всего, Tween-20) в низкой концентрации (0,05-0,5 %) добавляют в буфер, который используется для разведения антител, поскольку считается, что это частично блокирует их неспецифическое связывание с клеточными структурами.

Фиксация.

В иммуноцитохимии большое значение имеет правильный выбор фиксатора. С одной стороны, фиксатор должен быстро и эффективно остановить все внутриклеточные процессы и стабилизировать клеточные компоненты таким образом, чтобы они не смещались при последующих обработках относительно своего положения в живой клетке. С другой стороны, фиксатор не должен существенно изменять пространственную организацию белков, не должен приводить к маскировке или к повреждению антигенных детерминант, к которым получены антитела.

При работе с культивируемыми клетками животных самыми популярными фиксаторами являются глутаровый альдегид, формальдегид и метанол. Применительно к конкретной задаче эти фиксаторы могут также использовать последовательно в различных комбинациях.

Фиксация глутаровым альдегидом хорошо сохраняет структуру клеток, но за счет эффекта сшивания белков делает невозможным доступ антител ко многим антигенным детерминантам. Поэтому, за редкими исключениями, фиксацию глутаровым альдегидом применяют только после предварительной пермеабилзации клеток. Кроме того, фиксация глутаровым альдегидом приводит к появлению неспецифического связывания антител со свободными альдегидными группами. Для предотвращения неспецифического связывания перед иммуноцитохимической окраской клетки обрабатывают раствором боргидрида натрия, глицина или хлорида аммония.

В отличие от фиксации клеток для морфологического анализа,

формальдегидный фиксатор для иммуноцитохимического окрашивания рекомендуется готовить из порошка параформальдегида непосредственно перед использованием. Для многих антигенов такая фиксация дает удовлетворительные результаты, но требует проведения пермеабилзации до или сразу после фиксации. Однако формальдегидная фиксация может нарушать структуру наиболее чувствительных антигенов.

Фиксация холодным (-20°C) метанолом или ацетоном сильно повреждает мембранные клеточные структуры. Вместе с тем, частичное повреждение клеточной мембраны позволяет проводить иммуноцитохимическую окраску клеток без дополнительной пермеабилзации. Это метод фиксации позволяет сохранить наилучшим образом структуру белков-антигенов за счет того, что при фиксации метанолом не образуются внутрибелковые и межбелковые сшивки.

Для некоторых антигенов лучшие результаты получаются при использовании смесей метанола и низких концентраций формальдегида, как при комнатной температуре, так и при -20°C .

При исследовании поверхностных антигенов в ряде случаев для иммуноцитохимического анализа можно использовать нефиксированные клетки. Обычно реакция проводится при пониженной температуре, чтобы исключить фагоцитирование клетками антител, связывающихся с их поверхностью.

В любом случае, при исследовании новых белков одновременно используют несколько различных протоколов фиксации, чтобы исключить ошибочную интерпретацию полученных результатов.

Блокирование сайтов неспецифического связывания.

Хотя константа связывания антител с соответствующим антигеном существенно превосходит константу связывания этих антител с другими клеточными компонентами, в ряде случаев можно специальными обработками повысить специфичность иммуноцитохимической окраски. Для этого используют вещества, которые непрочно и неспецифично связываются с клеточными белками. Наиболее распространенными веществами, которые для этого используют, являются: 0,1-10% раствор бычьего сывороточного альбумина, 1-5 % раствор обезжиренного молока

(действующим агентом в этом случае является белок молока - казеин), яичный белок - овальбумин, неимунная сыворотка того животного, в котором были получены вторые антитела. Эти белки временно блокируют как специфический антиген, так и все другие. В процессе инкубации происходит конкуренция за места связывания между этими веществами и специфическими антителами. Так как антитела связываются с антигеном прочнее, то постепенно на специфических местах связывания происходит замещение молекул блокатора антителами, а все неспецифические места связывания примерно равновероятно связываются с антителами и с блокирующими белками. Поскольку концентрация блокирующих белков в растворе многократно выше, то практически все места потенциально неспецифического связывания антител оказываются закрытыми блокирующими белками. Те же немногочисленные места, где в процессе инкубации остались неспецифически связанные антитела, освобождаются ими при последующих отмывках.

Инкубация с антителами.

Для иммуноцитохимического окрашивания образцов концентрация антител должна составлять 0.5-10 мкг/мл. Обычно коммерческие антитела используются в разведении 1:100. В первом эксперименте, как правило, производится раститровка антител в концентрациях от 1:50 до 1:1000. Сыворотку или антитела обычно разводят буфером PBS (pH 7,4) с добавлением BSA (0,1-1%). Иногда в состав буфера также входит детергент Tween-20 (0.05-0,1 %) или Triton X-100 (0.1%). Время инкубации с антителами, как правило, составляет 1-2 часа при комнатной температуре, или 10-24 часа при +4°C, или 20-60 мин при +37°C. Условия инкубации образца с коммерческими антителами (буферный раствор для разведения, разведение исходного препарата антител, время инкубации и температурный режим) обычно указаны в прилагаемой инструкции к антителам.

Несвязавшиеся антитела отмывают тем же буфером, в котором были разведены антитела. Используют от трех до шести смен буфера, инкубируют клетки в каждой смене по 5-10 минут.

Необходимо помнить, что меченые антитела обычно можно использовать только в течение нескольких месяцев (иногда до 2 лет) при условии хранения их в холодильнике (+4°C), желательно в присутствии 0,1 % азида натрия для

предотвращения бактериального заражения. Если антитела предполагается использовать в течение более длительного времени, то их разводят в соотношении 1:1 в глицерине, разделяют на аликвоты, замораживают и хранят при -80°C или при -20°C . Каждая аликвота после первого использования вторично не замораживается и хранится при $+4^{\circ}\text{C}$. При длительном хранении связь флуорохрома (или коллоидного золота, используемого для электронномикроскопического исследования локализации антигена) с антителом может разрушаться, часть молекул флуорохрома отделяется от антител. При использовании такого раствора отделившийся флуорохром неспецифически связывается с различными клеточными белками. Для частичного предотвращения этого эффекта раствор длительно хранившихся меченых антител рекомендуется перед использованием отцентрифугировать (13000 g, 3 мин).

Двойное иммуноцитохимическое окрашивание.

Существуют экспериментальные задачи, для решения которых в образце нужно выявить два различных антигена. В этом случае для избежания перекрестных реакций (кросс-реакций) первые антитела к каждому из антигенов должны быть получены в животных разных видов. Вторые антитела связывают с разными флуорохромами, которые должны иметь непересекающиеся спектры возбуждения и испускания флуоресценции. Инкубацию можно проводить в смеси двух первых, а затем в смеси двух вторых антител. Если же концентрации двух антигенов сильно различаются, окрашивание ведут каждым антителом отдельно, так как антитела, связавшиеся с антигеном, количество которого в клетке больше, могут помешать взаимодействию других антител со вторым антигеном. Поэтому сначала проводят окрашивание первыми антителами к антигену, количество которого меньше, а затем первыми антителами ко второму антигену. В такой же последовательности обрабатывают клетки и вторыми антителами.

Контрольные препараты.

Во избежание неверной интерпретации результатов иммуноцитохимического окрашивания необходимо предварительно сделать несколько контрольных препаратов. Во-первых, нужно убедиться, что вторые антитела нормально работают с известными антигенами при данной фиксации и на данном типе клеток и подобрать оптимальную концентрацию вторых антител. Если это возможно, необходимо

проверить первые антитела в тех условиях, когда локализация антигена известна. Это можно сделать и непосредственно в процессе экспериментального окрашивания. Например, когда известно, где антиген выявляется в митотических клетках, но стоит задача изучить его локализацию на различных стадиях клеточного цикла в интерфазе. Такие эксперименты получили название положительных контролей. Вместе с тем, в ходе иммуноцитохимического исследования необходимо ставить и так называемые отрицательные контроли. Для этого часть препаратов вместо первых антител инкубируется с буферным раствором. Естественно, после обработки связанными с флуорохромом вторыми антителами окраска в таких препаратах должна отсутствовать. Особенно важны контроли при проведении двойного иммуноцитохимического окрашивания. В этом случае следует параллельно изготовить препараты, окрашенные отдельно на каждый из исследуемых антигенов. Это особенно важно, если антигены в клетке располагаются очень близко (например, являются белками одного функционального комплекса), когда возможно конкурентное связывание антител.

2. Экспериментальная часть.

Иммуноцитохимические реакции очень чувствительны к изменениям концентрации растворов антител. Поэтому все инкубации должны проводиться в условиях 100% влажности, чтобы исключить подсыхание инкубационных растворов. С другой стороны, необходимо проводить реакции на химически инертной и, желательно, несмачиваемой водой поверхности. Приведенным условиям соответствует влажная камера, нижняя поверхность которой покрыта пленкой парафильм (Parafilm). Наиболее удобными в использовании являются чашки Петри квадратной формы, но при их отсутствии можно использовать и стандартные круглые. Соответствующий форме и размерам чашки кусок парафильма отрезается и укладывается на ее дно так, чтобы защитная бумага оказалась сверху. Бумага аккуратно отделяется и удаляется, а парафильм фиксируется на поверхности чашки точечными касаниями обратной стороной пинцета. При необходимости можно выровнить поверхность парафильма «растягивающими» касаниями пинцета. Если в ходе подготовки к окрашиванию произошло случайное касание средней части подготовленного парафильма рукой, перчаткой или пинцетом, то лист парафильма

необходимо заменить на новый. Для поддержания постоянной влажности по краям чашки укладывают полоски фильтровальной бумаги, смоченные дистиллированной водой.

Объем капель блокирующего раствора и антител зависит от размера стекла с клетками. Для стекла диаметром 13 мм достаточно 30 мкл раствора антител или 50 мкл блокирующего раствора. Необходимо помнить, что концентрация и общее количество необходимых антител зависят и от количества клеток на стеклах. Если на стеклах имеется плотный монослой клеток, то общее количество необходимых для проведения окраски антител может вырасти в несколько раз по сравнению с окраской стекол, на которых расположены одиночные клетки или небольшие клеточные островки. Как уже указывалось, в предварительных экспериментах тестируется несколько концентраций антител в диапазоне от 1:50 до 1:1000. На практикуме для окраски будет предложена одна концентрация антител, которая была эмпирически подобрана для конкретного исследуемого антигена по результатам предварительных окрасок именно для тех клеток, которые используются для эксперимента.

При переносе стекла с клетками из раствора, блокирующего места неспецифического связывания антител (3% BSA на PBS), их не следует отмывать (хотя в некоторых протоколах такая процедура предусмотрена). Дело в том, что постепенное замещение специфическими антителами мест связывания BSA уже в растворе первых антител (где концентрация BSA ниже, чем в блокирующем растворе), более предпочтительно для получения специфичной окраски, чем предварительное освобождение части мест неспецифического связывания антител в процессе даже короткой отмывки.

Концентрация BSA в блокирующем растворе и в буфере для разведения АТ несколько отличается в различных протоколах. В предлагаемой практической задаче эти концентрации составляют 3% и 1 % соответственно. Снижение концентрации BSA до 1 % в блокирующем растворе и до 0,1 % в буфере для разведения антител и отмывок представляется нежелательным, так как оно продиктовано только экономией реактивов и может отрицательно повлиять на качество окраски. Оба эти буфера после полного растворения BSA, если есть такая возможность, желательно профильтровать через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм для удаления возможных загрязнений.

Добавление 0,05% Tween-20 в буфер для разведения антител и отмывок желательно, но не обязательно. Если буфер был предварительно профильтрован, можно также исключить и центрифугирование растворов первых антител. Что касается центрифугирования раствора вторых антител, то его необходимо производить, если стоковый раствор хранился в холодильнике более 2 месяцев.

Дополнительное окрашивание клеток ДНК-связывающим красителем DAPI можно осуществить на трех различных этапах окраски. А первом случае краситель добавляется в раствор вторых антител, во втором случае окрашивание производится в одном из растворов для отмывки после окраски вторыми антителами. Но наиболее удобным представляется способ, при котором DAPI (1 мкг/мл) добавляют непосредственно в среду заключения Mowiol (некоторые среды для заключения препаратов уже производятся с добавлением DAPI). В этом случае, помимо прочего, не происходит постепенной диффузии красителя и окраска ДНК остается неизменной в течение многих месяцев.

После просмотра препаратов их необходимо поместить в защищенную от света коробку и хранить в холодильнике. В зависимости от флуорохрома препараты остаются пригодными для повторного просмотра от нескольких месяцев до года.

Практическая работа: выявление ламин A/C в клетках культуры HeLa.

Цель работы: овладение методами иммуноцитохимического окрашивания.

Объект исследования: клетки культуры HeLa.

Приборы и реактивы: буфер PBS (pH 7,4), BSA, клетки культуры ткани HeLa на покровных стеклах, свежеприготовленный раствор параформальдегида (3,7%), чашки Петри 100 мм и 40 мм, электронномикроскопические пинцеты, детергенты Triton X-100 и Tween 20, моноклональные мышинные антитела специфичные к ламинам (клон Jo1 2), козы антимышинные антитела связанные с флуорохромом FITC, Mowiol, DAPI, DABCO, световой микроскоп с объективами x40, x63, x100, оборудованный для наблюдения методами эпифлуоресценции и фазового контраста.

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Клетки культуры HeLa, выращенные на покровных стеклах, 5 секунд промыть в теплом (37°C) буфере PBS и перенести в раствор формальдегида (3,7%). Продолжительность фиксации - 10 минут при комнатной температуре.
- 2) Клетки промыть в PBS 2 раза по 5 минут и провести пермеабиллизацию в 0,5% растворе Triton X-100 на PBS в течение 5 минут при комнатной температуре.
- 3) Отмыть от детергента в трех сменах PBS по 5 минут в каждой.
- 4) Проинкубировать в 3 % растворе BSA на PBS в течение 30 минут при комнатной температуре на каплях (клетками вниз!) во влажной камере в 100 мм чашках Петри.
- 5) Моноклональные мышинные антитела, специфичные к ламинам A/C (клон Jol 2), развести в буфере для инкубации (1% BSA, 0,05% Tween-20 на PBS, pH 7,4) в концентрации 1:100.
- 6) Пинцетом перенести стекла с клетками с каплей блокирующего раствора (PBS с 3 % BSA) на капли первых антител (клетками вниз!) и проинкубировать во влажной камере 1 час при комнатной температуре.
- 7) Стекла из влажной камеры перенести (клетками вверх!) в 40 мм чашки Петри с 3 мл буфера для отмывки (1% BSA, 0,05% Tween-20 на PBS). Отмыть в трех сменах буфера по 10 минут в каждой.
- 8) Вторые, связанные с флуорохромом козы антимышинные антитела, развести в буфере для инкубации (1% BSA, 0,05% Tween-20 на PBS, pH 7,4) в концентрации 1:100.
- 9) Пинцетом перенести стекла с клетками из чашек Петри на капли вторых антител (клетками вниз!) и проинкубировать во влажной камере 1 час при комнатной температуре в защищенном от света месте (например, закрыв чашку фольгой).
- 10) Стекла из влажной камеры перенести пинцетом (клетками вверх!) в 40 мм чашки Петри с буфером для отмывки (1% BSA, 0,05% Tween-20 на PBS), отмыть 10 минут. Далее отмыть 2 раза по 10 минут в чистом PBS.
- 11) Стекла (клетками вверх!), перенести пинцетом на фильтровальную бумагу, далее удалить излишки PBS касанием краем (!) стекла фильтровальной бумаги и положить

стекла (клетками вниз!) на каплю (10 мкл) среды заключения (Mowiol, DAPI 1 мкг/мл, DABCO 1мг/мл). Приготовленный препарат подписать, высушить в течение 2-3 часов при комнатной температуре (в темном месте) и хранить в холодильнике при температуре +4°C.

12) Препарат проанализировать, используя флуоресцентный микроскоп, сначала с использованием сухого объектива (x20 или x40), затем с использованием иммерсионного объектива (x63 или x100).

Данные о динамике ламин в митотическом цикле клеток HeLa, зафиксированных *in situ*, представлены на **Рис. 2**. В интерфазных клетках антитела к ламинам A/C окрашивают, преимущественно, периферию ядер, а также слабо окрашивают кариоплазму. В профазе, по мере разрушения ядерной оболочки, ламин A/C мигрируют в цитоплазму. В прометафазных, метафазных и анафазных клетках белки имеют строго цитоплазматическую локализацию. В телофазе ламин A/C преимущественно выявляются по периферии двух групп хромосом, а также в кариоплазме формирующихся дочерних ядер, при этом в цитоплазме на этой стадии также сохраняется слабое и гомогенное мечение антителами к ламинам A/C.

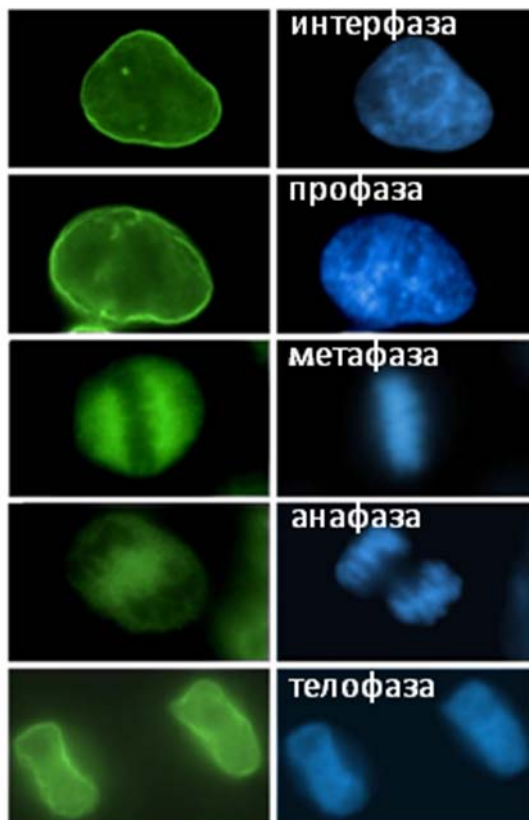


Рис. 2. Иммуноцитохимическая окраска на ламины A/C (левый ряд) клеток HeLa на различных стадиях митотического деления. В правом ряду показана окраска ДНК в тех же клетках красителем DAPI.

Глава 6. Флуоресцентная микроскопия.

1. Теоретическая часть.

Описанные в предыдущих главах методы микроскопического анализа успешно применяются для исследований структуры клеток, однако они не дают достаточных сведений о локализации специфических молекул. Одним из способов получения такой информации является флуоресцентная микроскопия, которая позволяет регистрировать положение флуоресцирующих молекул (**флуорохромов**) в клетках и тканях.

Явление флуоресценции связано со способностью молекул поглощать свет и затем снова испускать его. При поглощении атомом кванта света (фотона) достаточной энергии один из его электронов переходит на более высокий энергетический уровень, т.е. в возбужденное состояние. В этом состоянии электрон может проводить некоторое время, а затем возвращается в исходное состояние, испуская при этом энергию в виде нового фотона. Испускаемый фотон всегда несет меньшую энергию, чем поглощенный, и как следствие, имеет большую длину волны, т.к. энергия фотонов обратно пропорциональна длине волны. Реальные молекулы флуорохромов имеют более сложный набор энергетических состояний, поэтому могут поглощать (и испускать) кванты в более широком диапазоне энергий, характерном для данной молекулы. Тем не менее, все равно наблюдается характерное смещение испускаемых квантов в более длинноволновую область (т.н. Стоксов сдвиг). Далеко не все молекулы, перешедшие в возбужденное состояние, испускают затем кванты света. Часть энергии фотонов может выделяться в виде тепла, в других случаях электроны могут переходить в т.н. триплетное состояние и молекула при этом теряет способность флуоресцировать. Совокупность всех этих процессов определяет такое важное свойство флуорохромов как квантовый выход. **Квантовый выход** показывает долю молекул флуорохрома, испустивших квант света, от общего числа молекул, поглотивших фотоны, выражаемую в процентах. Чем выше квантовый выход, тем ярче свечение флуорохромов. Чтобы замедлить разрушение флуорохромов и постепенное гашение флуоресценции, в препараты вводят антиоксиданты, такие как n-пропилгаллат, 1,4-диазобицикло-2,2,2-октан (DABCO), пара-фенилендиамин и др.

Для использования в качестве красителей во флуоресцентной микроскопии, флуорохромы должны обладать также определенным химическим средством к различным клеточным компонентам, что и позволяет с их помощью проводить микроскопический анализ распределения и динамики биологических макромолекул и внутриклеточных структур. Например, некоторые флуорохромы (иодистый пропидий, DAPI, акридиновый оранжевый, Хехст 33258) селективно взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами и используются для визуализации хромосом и ядер, а также РНК. Они часто используются в сочетании с другими флуорохромами для удобства идентификации клеток. Некоторые флуорохромы меняют свои спектральные свойства при взаимодействии с различными ионами и малыми молекулами и используются для измерений внутриклеточного рН, концентрации Ca^{++} и т.п. Однако чаще всего флуорохромы используются в качестве меток, присоединенных к антителам, которые и определяют специфичность связывания флуорохрома с исследуемыми молекулами (см. Главу 5). Наконец, с при помощи методов генетической инженерии можно присоединить к гену исследуемого белка фрагмент, кодирующий флуоресцентный белок и экспрессировать полученные конструкции в живых клетках. Этот подход позволяет анализировать локализацию и динамику исследуемых белков (или субклеточных структур, в состав которых он входит) при помощи флуоресцентной микроскопии непосредственно в живых клетках.

Флуоресцентный микроскоп.

Специализированные модели микроскопов, предназначенные для наблюдения флуоресценции, содержат систему светофильтров, позволяющих, благодаря Стоксову сдвигу, эффективно разделить возбуждающий и испускаемый свет и таким образом наблюдать раздельно свечение различных флуорохромов. Эта система состоит как минимум из двух компонентов:

- **возбуждающего светофильтра**, располагающегося между источником света и объектом и пропускающего только свет определенной длины волны, соответствующей максимуму поглощения данного флуорохрома;

- **барьерного светофильтра**, располагающегося между объектом и окулярами или фотокамерой, и отражающего все длины волн (включая возбуждающий свет) кроме тех, которые соответствуют спектру испускания используемого флуорохрома.

Барьерные фильтры могут быть узкополосными (band-pass), т.е. пропускающими свет в узком диапазоне, или односторонними (long-pass), пропускающими весь свет длинее определенной длины волны. Поскольку спектры излучения разных флуорохромов могут частично перекрываться, то применение band-pass фильтров позволяет более качественно разделить их сигналы и снизить фон, тогда как long-pass фильтры пропускают больше света.

Поскольку интенсивность испускаемого флуорохромами света гораздо ниже, чем интенсивность возбуждающего флуоресценцию света падающего на препарат, в современных моделях флуоресцентных микроскопов для более эффективного разделения этих двух световых потоков реализован режим **эпифлуоресценции**, когда возбуждающий свет падает на препарат сверху. В этом случае объектив играет роль конденсора, фокусирующего свет на препарате. Кроме того, в оптической схеме используется дополнительный элемент — **светоделительное зеркало**, располагающееся под углом 45° к направлению световых потоков и отражающее свет коротковолнового диапазона, но пропускающее более длинноволновые фотоны. Длина волны отсечения подбирается для каждого флуорохрома индивидуально, чтобы направлять возбуждающий свет от источника освещения на препарат и пропускать испускаемый свет в окуляры микроскопа или на светочувствительную матрицу камеры. В современных моторизованных микроскопах возможна автоматическая смена светофильтров, что облегчает наблюдение и фотографирование распределения нескольких флуорохромов в одном препарате и позволяет анализировать их взаимное расположение. Для локализации нескольких флуорохромов также применяются многополосные запирающие фильтры и светоделительные зеркала (так называемый набор Пинкеля). В этом случае переключение с одного флуорохрома на другой осуществляется только за счет смены возбуждающих светофильтров.

Для возбуждения флуоресценции необходимы источники света с высокой яркостью. Чаще всего для флуоресцентной микроскопии используются ртутные лампы высокого давления, ксеноновые лампы или лазеры. Ртутные лампы обладают неравномерной интенсивностью свечения в разных областях спектра, давая узкие пики, однако наиболее широко распространенные флуорохромы специально создавались для использования с ртутными лампами, поэтому максимумы их

спектров поглощения хорошо соответствуют максимумам интенсивности свечения ртутных ламп. Из-за небольшого срока службы (100-300 часов) и падения интенсивности свечения со временем ртутные лампы в последнее время заменяются металло-галогенными, рабочий ресурс которых при незначительных колебаниях яркости значительно больше. Ксеноновые лампы имеют более гладкий спектр излучения, что делает их пригодными для использования со многими флуорохромами. К преимуществам лазерных источников света для флуоресцентной микроскопии следует отнести высокую яркость и практически монохроматичное излучение, а также малый размер источника и слабое расхождение пучка света. Эти характеристики особенно успешно применяются в лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Лазерные источники света весьма дороги, однако введение в практику диодных лазеров позволило существенно удешевить конструкцию и сделать такие осветители более доступными.

Помимо специальных фильтров и источников света, флуоресцентная микроскопия предъявляет особые требования к оптике и системам детекции флуоресценции. Из-за низкой эффективности процесса флуоресценции и больших потерь энергии в оптической системе лишь около 1% энергии от источника освещения доходит до препарата, а на детектор попадает не более 20% испускаемого света. Поэтому флуоресцентные микроскопы оборудуют объективами с максимальной числовой апертурой, что позволяет наиболее полно собирать свет, испущенный флуорохромами. При слабой флуоресценции предпочтительнее использовать объективы типа ахромат или флуорит, которые содержат меньше оптических элементов, чем план-апохроматы, и поэтому снижение интенсивности света при прохождении через такие объективы меньше. Несмотря на нескорректированные aberrации, эти объективы предпочтительнее для исследования живых клеток, когда проблемы фототоксичности (изменения физиологии клетки под действием интенсивного освещения) и регистрации подвижных структур требуют применения коротких экспозиций. Однако для исследования фиксированных клеток и достижения максимального разрешения объективы типа план-апохромат являются незаменимыми.

В современных микроскопах для детекции флуоресценции чаще всего используют высокочувствительные CCD-камеры (Charge-Coupled Device, прибор с зарядовой

связью), которые практически полностью вытеснили фотопленку. При сопоставимом разрешении, CCD-камеры более чем на два порядка превосходят фотопленку по чувствительности. Однако более важны для флуоресцентной микроскопии является не столько чувствительность CCD-камеры, сколько уровень шумов, генерируемых в процессе ее работы. Темновой шум, возникающий в результате теплового движения атомов в светочувствительном элементе CCD-камеры, обычно компенсируется глубоким многоступенчатым охлаждением (до температуры -30°C и ниже). Шум, возникающий в результате работы электронных компонентов по преобразованию накопленных на матрице камеры зарядов в цифровой сигнал, пропорционален скорости этого преобразования, поэтому при медленном считывании информации с матрицы шум существенно снижается. Сложнее всего избавиться от шума от попадания на светочувствительные элементы случайных фотонов. Считается, что для надежной детекции соотношение сигнал/шум должно быть не менее 3. Хотя теоретически CCD-камеры способны детектировать одиночные фотоны, на практике минимальный значимый уровень сигнала составляет около 8 фотонов.

В зависимости от направления хода лучей и, соответственно, в зависимости от положения объектива и конденсора, различают два типа флуоресцентных микроскопов. Если объектив находится над препаратом, то микроскоп называют прямым, а если объектив находится под препаратом, то микроскоп называют инвертированным. В настоящей работе будет использован инвертированный микроскоп.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа: Изучение структуры хроматина и ядерной оболочки в процессе митотического деления клеток.

Цель работы: овладение практическими навыками работы на флуоресцентном микроскопе.

Объект исследования: клетки СПЭВ, экспрессирующие белок ядерной оболочки ламин А, меченый GFP (зеленым флуоресцирующим белком).

Приборы и реактивы: инвертированный флуоресцентный микроскоп, предметные стекла, пинцет, 15-мл пробирки с завинчивающейся крышкой, клетки СПЭВ-ламин А-GFP, растущие на покровных стеклах в чашке Петри, 37% раствор пара-

формальдегида, 10хФСБ (фосфатно-солевой буфер , рН 7.4), ДАПИ (водный раствор 1 мг/мл), Мовиол.

Последовательность экспериментальных операций:

1. В 15-мл пробирке приготовить 10 мл 3.7% раствора параформальдегида в ФСБ. Для этого к 8 мл дистиллированной воды добавить 1 мл 37% параформальдегида и 1 мл 10хФСБ и перемешать переворачиванием пробирки.
2. Слить культуральную среду из чашки с клетками и дважды ополоснуть клетки теплым (37°C) ФСБ.
3. Налить в чашки приготовленный раствор формальдегида и фиксировать клетки в течение 10-15 мин при комнатной температуре.
4. Промыть клетки ФСБ 2 раза по 5 мин.
5. Приготовить 5 мл рабочего раствора ДАПИ (0.1 мкг/мл) в ФСБ. Окрашивать клетки в течение 10 мин. Ополоснуть ФСБ.
6. Взять из холодильника (-20°C) пробирку с Мовиолом и нагреть ее до комнатной температуры, Мовиол должен расплавиться и стать прозрачным. Нанести 40-50 мкл Мовиола на предметное стекло. Взять покровное стекло с клетками пинцетом за край, прикоснувшись краем стекла к фильтровальной бумаге промокнуть излишки жидкости и положить стекло клетками вниз на каплю Мовиола. Осторожно удалить избыток Мовиола по краям стекла фильтровальной бумагой, стараясь не двигать стекло. Оставить стекло в горизонтальном положении в темноте до застывания Мовиола (около 1 часа при комнатной температуре).
7. Проверить рукой температуру домика лампы. Если домик теплый, то необходимо выяснить, когда была выключена лампа. **Категорически запрещается включать ртутную лампу снова, до того момента, как она полностью остыла (минимум 20 минут поле выключения). Нарушение этого правила может привести к взрыву лампы и повреждению оптики!** Включить источник питания ртутной лампы микроскопа. Убедиться, что лампа зажглась, и включить микроскоп, затем камеру.

8. В инвертированном флуоресцентном микроскопе установить объектив х63 в рабочее положение и нанести на линзу каплю иммерсионного масла. **Не касаться пипеткой линзы объектива!**
9. Поместить предметное стекло клетками вниз на предметный столик и поднять объектив при помощи макровинта до прикосновения стекла к капле масла.
10. Установить в оптический путь фильтры для ДАПИ, передвигая каретку с фильтрами в нужное положение. Переключить оптический путь на окуляры и наблюдая препарат в окуляры, продолжать поднимать объектив при помощи макровинта до появления резкого изображения ядер, светящихся синим светом.
11. Перемещая столик в горизонтальной плоскости, найти митотические клетки. Сфотографировать изображение митотической клетки в канале ДАПИ, затем переместить каретку фильтров в положение FITC и сфотографировать то же поле зрения в канале зеленой флуоресценции. Долгое наблюдение препарата приводит к постепенному выцветанию флуоресценции, поэтому фотографировать надо сразу после смены фильтров и корректировки фокуса.

Глава 7. Электронная микроскопия.

1. Теоретическая часть.

Оптическая микроскопия в ее классическом варианте не позволяет анализировать объекты, размеры которых меньше половины длины волны света (т.е. примерно 200 нм, см. Главу 1). В то же время, большинство субклеточных структур имеет размеры, не превышающие нескольких десятков нанометров. Поэтому изобретение электронной микроскопии ознаменовало собой революционный прорыв в области исследований морфологии нанобъектов. Электронная микроскопия основана на принципе Де Бройля, согласно которому любые частицы обладают волновыми свойствами и длина волны их обратно пропорциональна массе частицы и ее энергии. Электроны имеют отрицательный заряд, что позволяет управлять их движением при помощи регулируемого магнитного поля, фокусируя пучок электронов подобно тому, как пучок света фокусируется стеклянными линзами светового микроскопа. Для электронов с энергией 200 кЭв длина волны будет около 2.5×10^{-12} м (0,0025 нм), следовательно теоретическое разрешение микроскопа при использовании таких электронов будет около 0,001 нм. Для сравнения напомним, что расстояние между ядрами атомов водорода и кислорода в молекуле воды равно 0,099 нм. Однако максимального разрешения, которое теоретически может быть получено при использовании электронов, в настоящее время достигнуть не удастся. В первую очередь, это связано с тем, что качество электронных линз, преобразующих пучок электронов, пока существенно ниже, чем качество оптических линз, используемых в световой микроскопии для преобразования пучка фотонов. Кроме того, для биологических объектов, существенное снижение реально достигаемого разрешения происходит из-за недостаточно высокой их электронной плотности.

Тем не менее, постоянный прогресс как в области разработки новых типов линз, источников электронов, детекторов электронов и т.д. позволяет получать все более высокое разрешение при работе с этим типом приборов. Этот прогресс существенно раздвинул сферу применения просвечивающих электронных микроскопов, делая его ценным инструментом для исследователей, работающих в области биоинженерии и биотехнологии.

Просвечивающий электронный микроскоп состоит из элементов, эквивалентных элементам, составляющим световой микроскоп (**Рис.1**), только вместо источника света в этих приборах используется источник электронов – *электронная пушка*.

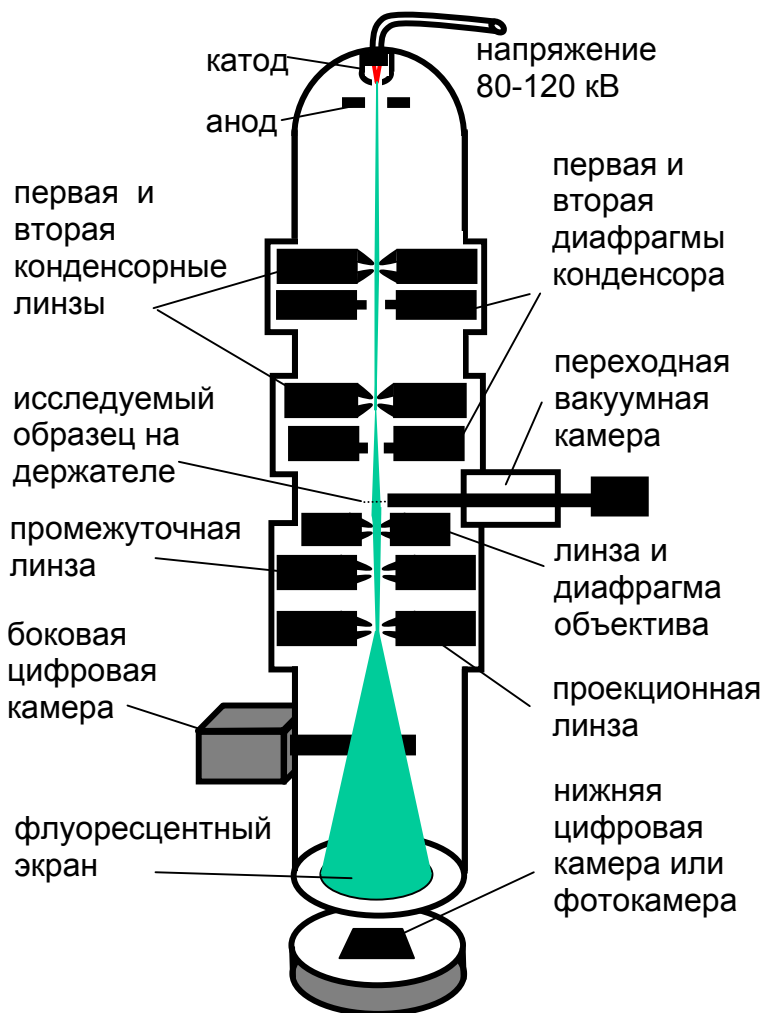


Рис. 1. Принципиальная схема электронного микроскопа.

Катод представляет собой либо тонкую вольфрамовую проволоку (диаметр 0.1 мм), изогнутую в виде буквы V, либо кристалл гексаборита лантана. Катод находится под высоким напряжением от 80 до 120 киловольт относительно анода, который заземлен. Вследствие разницы потенциалов между катодом и анодом электроны разгоняются и направляются вниз по колонне микроскопа.

Пучком электронов управляют при помощи магнитных линз. Конденсорные линзы необходимы для равномерного «освещения» объекта электронами, объективная линза формирует первичное изображение, а промежуточная и проекционная линзы увеличивают первичное изображение до удобного для наблюдения или фотографирования размера. Изображение, формируемое электронами, может быть сфотографировано, если электроны попадают на фотопластинку или на матрицу цифровой камеры, либо изучено визуально, если электроны падают на специальный флуоресцирующий экран. Цифровые камеры могут располагаться или по ходу электронного пучка до флуоресцирующего экрана («боковые» камеры), или под ним («нижние» камеры), как и фотокамеры.

Необходимо обратить внимание на то, что, если в оптическом микроскопе для получения разных увеличений используются объективы разного увеличения, в электронном микроскопе объективная линза всего одна, и именно она определяет разрешение микроскопа. Увеличение конечного изображения меняется с помощью промежуточных линз и проекционной линзы.

Важным элементом электронного микроскопа является вакуумная система. Поддержание высокого вакуума в колонне микроскопа необходимо для достижения максимального разрешения, т.к. в результате столкновения с молекулами газов электронный пучок может рассеиваться. С другой стороны, в высоком вакууме срок службы катодов существенно возрастает из-за отсутствия окисления. Наконец, в вакууме замедляется разрушение образцов, поскольку при взаимодействии с пучком электронов молекулы газа ионизируются и оседают на образце. В стандартных микроскопах поддерживается вакуум 10^{-9} - 10^{-10} атм.

Подготовка образцов для наблюдения в электронный микроскоп.

В отличие от оптических микроскопов, в электронных микроскопах образцы подвергаются сильному радиационному воздействию и могут им повредиться.

Кроме того, биологические структуры должны быть стабилизированы с максимальным сохранением нативной организации. Поэтому для электронной микроскопии биологических объектов важнейшее значение имеет процедура подготовки образца.

Толщина объектов, которые можно наблюдать в электронный микроскоп не превышает, обычно, 100 нм. Это связано с тем, что электроны рассеиваются в результате столкновений с атомами образца, и в результате разрешающая способность прибора сильно снижается. К тому же в толстых образцах часть электронов поглощается и их энергия переходит в тепло. Неравномерный нагрев образца приводит к его деформации и повреждению. Для преодоления этих проблем используют более высокое ускоряющее напряжение и охлаждение образцов. Так называемые мегавольтные микроскопы (с ускоряющим напряжением до 10^6 вольт) позволяют наблюдать образцы толщиной в несколько микрон. Однако в наиболее распространенных приборах с ускоряющим напряжением 100 кВ целиком можно наблюдать только очень мелкие объекты: макромолекулярные комплексы, вирусы и некоторые бактерии. В других случаях приходится применять технику ультратонких срезов. Для этого используются специальные приборы – ультрамикротомы.

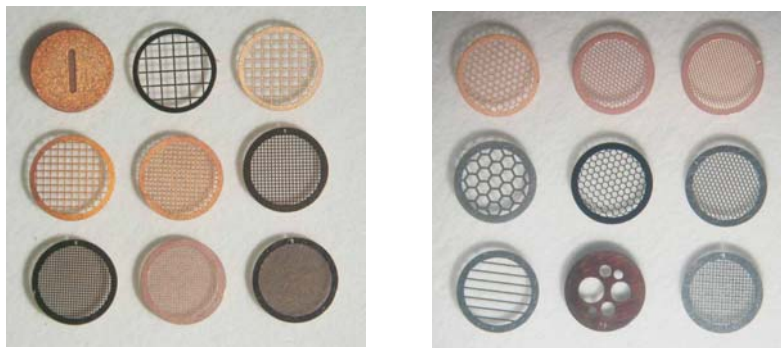


Рис. 2. Различные типы сеточек для электронномикроскопических образцов.

Объекты помещают в микроскоп на *поддерживающей металлической сеточке*, на поверхности которой нанесена пленка, которая практически прозрачна для

электронов. Сетки имеют стандартный диаметр 3.05 мм, однако могут отличаться материалом, из которого они изготовлены (медь, никель, золото), размером, числом и формой ячеек (**Рис. 2**).

Наиболее распространены медные сетки, а никелевые и золотые используют в случае необходимости обработки препаратов реагентами, взаимодействующими с медью.

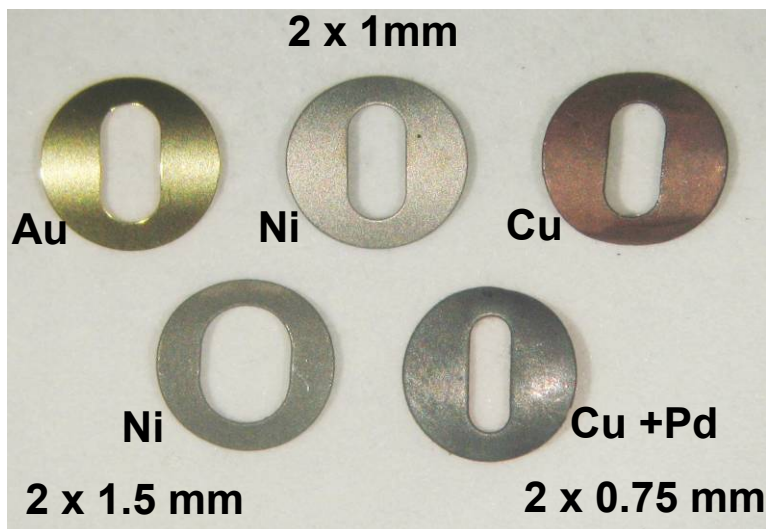


Рис. 3. Бленды (one-slot-grids) из различных материалов: золота, никеля, меди без покрытия и со специальным покрытием из палладия. Размер «окна» также может быть различным.

Для исследования многочисленных мелких объектов (макромолекулы, вирусы и т.п.) используют сетки с большим количеством ячеек, т.к. объекты целиком помещаются внутри ячеек, а повреждение пленки в отдельных ячейках не влияет на наблюдение объектов в соседних с ними. Для крупных объектов или при изучении серийных срезов предпочтительнее использовать бленды (сетки с одной большой ячейкой), чтобы избежать вероятности попадания частей объекта на перекрестья

сеток (**Рис. 3**). Однако при работе с блендами надо проявлять большую осторожность, чтобы не повредить пленку.

Поддерживающая пленка изготавливается из полимера формвара, растворенного в дихлорэтаноле или хлороформе. Чистое стекло погружают в раствор формвара, вынимают и дают стечь избытку раствора на фильтровальную бумагу. После высыхания раствора в течение нескольких минут на стекле образуется тонкая пленка формвара. Ее снимают погружением стекла в воду под углом 45° (**Рис. 4**). Пленка отделяется от стекла и переходит на поверхность воды. На плавающую пленку раскладывают сетки и опускают на нее чистое стекло или кусок парафильма. Прилипшие к стеклу сетки вынимают из воды и высушивают.

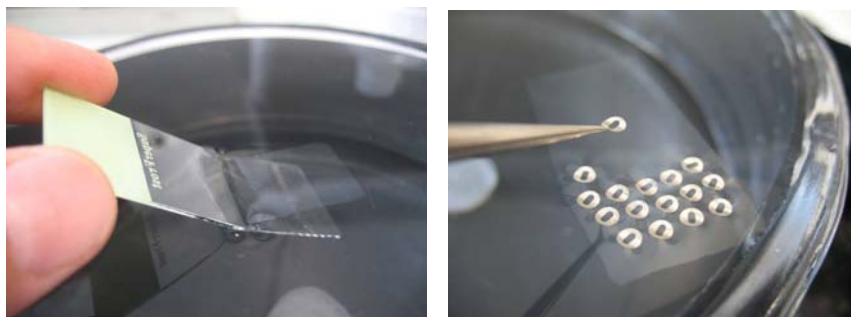


Рис. 4. Отделение формваровой пленки от стекла на поверхности воды (слева) и раскладка бленд на поверхность этой пленки (справа).

Методы изучения макромолекулярных комплексов

Биологические объекты состоят в основном из легких атомов, которые слабо взаимодействуют с электронами, что обуславливает их низкий контраст при наблюдении в электронный микроскоп. Поэтому важным этапом подготовки образца является его контрастирование. Для контрастирования используют соли тяжелых металлов. Различают позитивное и негативное контрастирование (**Рис. 5**)

Метод негативного контраста – используется для изучения изолированных объектов (вирусов, клеточных органелл, макромолекул и их

комплексов). При использовании этого метода контраст создается благодаря распределению контрастирующей жидкости вокруг объекта или во внутренних полостях его, тогда как сам объект остается электропрозрачным. В результате можно наблюдать изображение светлого объекта на темном фоне (негатив). Для негативного контрастирования сначала суспензию исследуемых частиц наносят на сетку с пленкой-подложкой. После адсорбции частиц на пленке избыток суспензии отсасывают фильтровальной бумагой и наносят каплю контрастирующего раствора (2% уранилацетат, 2% молибдат аммония). Через несколько секунд избыток краски удаляют и сетки высушивают.

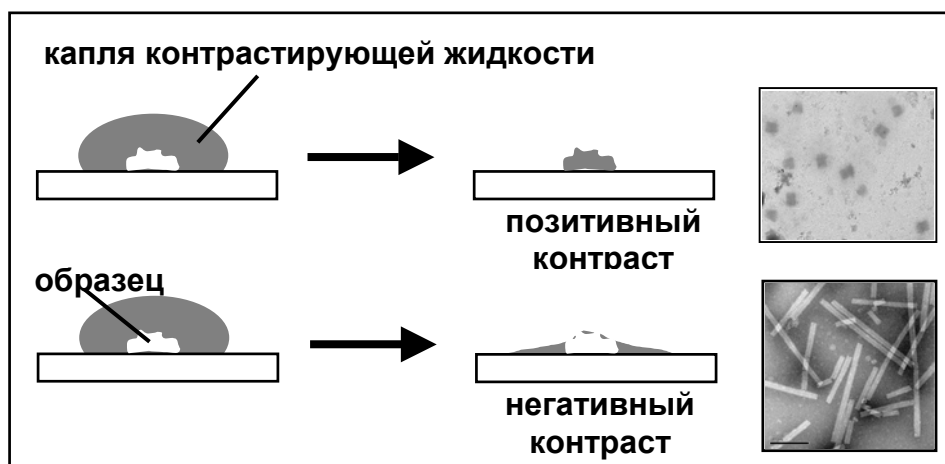


Рис. 5. Выявление структуры образца при использовании позитивного контраста (фракция выделенных центриолей после контрастирования фосфорновольфрамовой кислотой) и негативного контраста (препарат вируса табачной мозаики после контрастирования молибдатом аммония).

Подготовка клеток для ультраструктурного изучения.

В этом разделе будут последовательно описаны основные этапы подготовки образцов для исследования в электронный микроскоп на примере культивируемых клеток животных.

Фиксация.

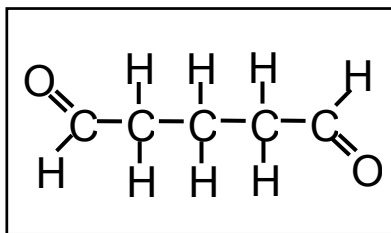
Все задачи ультраструктурного изучения клеток и тканей можно разделить на две группы – изучение морфологии клеток и распределения в клетке определенных белков или нуклеиновых кислот с помощью специфического мечения. В каждом случае протокол фиксации будет различным.

В морфологических исследованиях чаще всего используют три фиксирующих агента – формальдегид, глутаровый альдегид и четырехокись осмия. Формальдегид имеет небольшие размеры и очень быстро проникает в клетки. В водных растворах он находится в гидратированной форме (**Рис. 6**). Формальдегид взаимодействует преимущественно с белками, но качество фиксации недостаточно высокое из-за короткой длины образующихся сшивок. В результате макромолекулы стабилизируются достаточно хорошо, но межмолекулярные сшивки образуются неэффективно. Намного лучшей фиксации можно добиться при использовании диальдегида – глутарового альдегида, который образует многочисленные межбелковые связи, фактически сшивая все внутриклеточное содержимое в довольно плотную сеть. Скорость проникновения глутарового альдегида меньше, чем у формальдегида, но при использовании культивируемых клеток или очень маленьких кусочков ткани (менее 1 мм³) этот фактор не играет существенного значения. Иногда используют смесь формальдегида и глутаральдегида. Первый обеспечивает быструю префиксацию, а второй — жесткую последующую стабилизацию биологических структур.

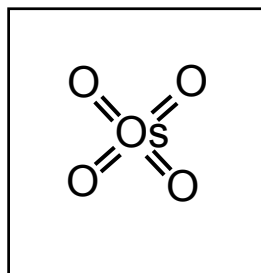
Для фиксации мембран, липидных гранул, липосом и т.п. используют четырехокись осмия, т.к. альдегиды плохо взаимодействуют с липидами. Это фиксирующее вещество медленно проникает в ткани, поэтому, как правило, проводят последовательную фиксацию глутаровым альдегидом, а затем четырехокисью осмия.

При фиксации клеток и тканей важно обращать внимание на pH и тоничность буферного раствора, в котором разводят фиксирующие вещества. Чаще всего используют либо 0.1 М фосфатный буфер Зеренсена, либо какодилатный буфер с pH 7.2-7.4.

Глутаральдегид



Тетраоксид осмия



Формальдегид

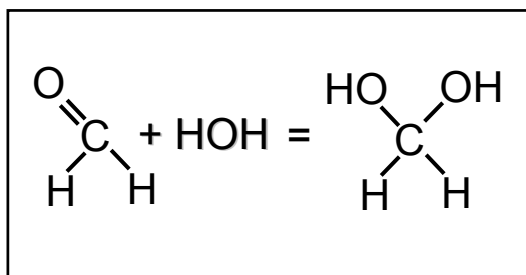


Рис. 6. Основные фиксаторы, используемые в электронной микроскопии.

Обезвоживание и заключение в заливочные среды. Для изготовления качественных ультратонких срезов материал должен быть достаточно твердым и гомогенным по плотности. Это достигается либо замораживанием объектов после фиксации (метод Токуясу), либо пропиткой образца специальной заливочной средой с ее последующей полимеризацией. Наиболее распространенные заливочные среды на основе эпоксидной смолы (Эпон) гидрофобны, поэтому перед заключением в смолу образцы необходимо обезвоживать и перевести в органический растворитель (спирт, ацетон, пропиленоксид). Обезвоживание следует проводить постепенно, чтобы избежать сморщивания клеток, поэтому его проводят в несколько этапов, постепенно повышая концентрацию органического растворителя (например, используют спирты в концентрации 50%, 70%, 80%, 96%). После обезвоживания образец постепенно пропитывают смесью растворителя и заливочной среды, что позволяет постепенно заменить растворитель на смолу. При этом надо учитывать, что мономеры смолы

имеют больший размер и обладают заметно большей вязкостью, а значит, этот процесс может потребовать значительного времени.

Затвердевание эпоксидных смол происходит при нагревании. Образцы, пропитанные смолой, инкубируют сначала при 37°C в течение суток, чтобы снизить вязкость смолы и добиться ее более равномерного распределения в образце (в процессе этой инкубации из образца испаряются также остатки растворителя), а затем при 60°C в течение как минимум двух суток до полной полимеризации. Материал, заключенный в эпоксидные смолы, хорошо режется и демонстрирует оптимальную сохранность ультраструктуры. Однако для исследований локализации специфических молекул (например, методами иммуноцитохимии) эта смола не очень пригодна из-за своей гидрофобности. В этом смысле акриловые смолы (LR White, Lowicryl) обладают серьезным преимуществом: они гидрофильны и водорастворимые реагенты могут частично проникать внутрь среза, увеличивая объем материала, доступного для реакции, они также обладают пониженной вязкостью и способностью полимеризоваться при низкой температуре под действием ультрафиолетового облучения. В этих условиях не происходит денатурации белков, а значит антигенные детерминанты лучше сохраняются.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа № 1. Изучение вирусных частиц с помощью метода негативного контраста.

Все методы, используемые в электронной микроскопии требуют большой аккуратности. Необходимой предпосылкой успеха является правильная организация рабочего места. Особое внимание следует обратить на чистоту и хорошее освещение. Существует два способа проведения окраски методом негативного контраста. В первом случае капли суспензии и красителя наносят на парафильм, а затем сетки или бленды перекалывают с одной капли на другую. При выполнении этой практической работы будет использован второй способ - капли суспензии наносятся на сетки, зажатые в пинцеты.

Цель работы: овладение методом негативного контраста.

Объект исследования: препарат вируса гриппа.

Приборы и реактивы: отцентрифугированный на максимальной скорости раствор молибдата аммония, кусочки фильтровальной бумаги, микропипетка и чистые кончики для нее; электронные пинцеты, сеточки, покрытые формваровой пленкой.

Меры безопасности при проведении работы: большинство веществ, используемых при проведении этих процедур, являются ядовитыми, поэтому работать необходимо в халате и в перчатках и выполнять все манипуляции с образцами в вытяжном шкафу.

Последовательность экспериментальных операций:

1. Зажать сетки в пинцеты и расположить их на небольшом возвышении (например, на крышке от чашки Петри).
2. На каждую сетку нанести по 10 мкл изучаемой суспензии. Через 30 секунд каплю удалить, коснувшись края сетки куском фильтровальной бумаги.
3. Если суспензия была приготовлена на каком-либо буфере с высокой ионной силой, промыть поверхность сетки, нанеся на ее поверхность 10 мкл дистиллированной воды (или 5 мМ Tris-буфера), которую немедленно удалить, коснувшись края сетки куском фильтровальной бумаги. Эту процедуру повторить 3 раза.
4. Нанести на сетку 10 мкл раствора молибдата аммония и через 20 секунд удалить каплю коснувшись края сетки куском фильтровальной бумаги.
5. Дать препаратам высохнуть и аккуратно перенести сетки в специальные контейнеры. Пока препараты сохнут их необходимо аккуратно накрыть крышкой от чашки Петри, чтобы избежать попадания пылинок на сетки. Препарат можно просматривать в электронном микроскопе через 20 минут после окраски.

Практическая работа № 2. Заключение клеток культуры HeLa эпоксидную смолу Эпон 812.

Цель работы: овладение методом подготовки препарата для электронной микроскопии.

Объект исследования: клетки культуры HeLa.

Приборы и реактивы: глутаровый альдегид 25% (Electron microscopy grade), фосфатный буфер, 50, 70, 90 % водные растворы этилового спирта, 100% спирт, ацетон, эпоксидная смола, заливочные плашки, термостаты на 37°C и 60°C, дистиллированная вода.

Меры безопасности при проведении работы: большинство веществ, используемых при проведении этих процедур, являются ядовитыми, поэтому работать необходимо в халате и в перчатках и выполнять все манипуляции с образцами в вытяжном шкафу. Катализатор DMP-30, который используется при приготовлении Эпона, обладает канцерогенным действием. Поэтому всю испачканную Эпоном посуду, фильтровальную бумагу, перчатки, кончики пипеток и т.д. необходимо поместить в термостат на +60°C на несколько дней. За это время Эпон полностью заполимеризуется и станет неопасен.

Последовательность экспериментальных операций:

1. Приготовить 2,5% раствор глутарового альдегида на 0.1 М фосфатном буфере Зеренсена (рН 7,4).
 2. Удалить пипеткой из чашки Петри культуральную среду, клетки быстро промыть буфером Зеренсена, после чего в чашку Петри налить фиксатор. Время фиксации при комнатной температуре 1.5 часа.
 3. Отмыть фиксатор в трех сменах (по 5 минут) фосфатного буфера.
 4. Развести буфером Зеренсена исходный раствор четырехоксида осмия (2-4%) до конечной концентрации 1% непосредственно перед использованием. Постфиксацию проводить на каплях (**клетками вниз!**) во влажной камере на поверхности парафильма, в темноте, при комнатной температуре в течение 1 часа. **Важно!**
- Тетраоксид осмия летуч и сильно ядовит!**
5. Отмыть стекла с клетками в чашках Петри в трех сменах дистиллированной воды по 5 минут.
 6. Проинкубировать стекла с клетками в 50% водном растворе этилового спирта (2 смены по 5 минут). В ходе этих двух промывок из клеток вымывается непрореагировавшая четырехокись осмия, при этом раствор спирта может почернеть. Необходимо добиться, чтобы последний спиртовой раствор был прозрачным, поэтому иногда число смен спирта необходимо увеличить.
 7. Проинкубировать стекла с клетками в 70% водном растворе этилового спирта (2 смены по 10 минут).
 8. Оставить клетки на ночь в 2% растворе уранил ацетата на 70 % спирта при температуре +4°C. Если предполагается контрастировать препараты уранил

ацетатом непосредственно на срезах, то эту обработку нужно пропустить и сразу после пункта 7 продолжить обезвоживание препарата в 90% спирте.

9. Проинкубировать стекла с клетками в 90% водном растворе этилового спирта (2 смены по 15 минут).

10. Проинкубировать стекла с клетками в 100 % этиловом спирте (2 смены по 20 минут).

11. Перенести стекла с клетками в стеклянную или полиэтиленовую посуду, устойчивую к ацетону. **Важно! Не забыть нанести маркировку препаратов на новую посуду, чтобы не перепутать образцы!**

12. Проинкубировать стекла с клетками в 100 % ацетоне (3 смены по 20 минут). Следить, чтобы при инкубации и смене ацетона поверхность стекол с клетками не подсыхала.

13. Проинкубировать стекла с клетками в смеси 100 % ацетона и Эпона (2 к 1, 1 час).

14. Проинкубировать стекла с клетками в смеси 100 % ацетона и Эпона (1 к 2, 1 час) с открытыми пробками под тягой.

15. Проинкубировать стекла с клетками в Эпоне (на ночь) с открытыми пробками под тягой.

16. Перенести стекла с клетками в заливочные плашки, залить новой сменой Эпона, оставить на 24 часа в термостате при 37°C.

17. Провести полимеризацию Эпона в термостате при – 48 ч при 60°C.

18. Отделить стекла от заливок. Для этого очистить поверхность стекол от Эпона, поместить заливки в горячую воду и затем быстро их перенести в емкость с жидким азотом. При необходимости повторить эту операцию несколько раз. Под микроскопом найти клетки и заточить на них пирамидку. Препарат готов к изготовлению на ультрамикротоме полутонких или ультратонких срезов.

Глава 8. Определение параметров клеточного цикла.

1. Теоретическая часть.

Ядро начали изучать ранее других клеточных органелл, поэтому исторически сложилось так, что понятия клеточный цикл и ядерный цикл используются как синонимы. В настоящее время принято разделять весь клеточный цикл на митоз – фазу, когда хромосомы находятся в компактном конденсированном и неактивном состоянии, и интерфазу - фазу между делениями, когда хромосомы деконденсированы и транскрипционно активны. Митоз подразделяется на профазу, прометафазу, метафазу, анафазу и телофазу. В свою очередь, интерфаза подразделяется на синтетическую фазу S (от Synthesis), в ходе которой происходит удвоение генетического материала - репликация ДНК, предшествующую ей фазу G_1 (от Gap) и следующую за S- фазой и предшествующую митозу фазу G_2 . Впервые такое деление клеточного цикла на фазы было предложено А. Howard и S.R. Pelk в 1953 году. Некоторые авторы дополнительно подразделяют фазу G_1 на две стадии G_1 -pm (G_1 постмитотическая или ранняя) и G_1 -ps (G_1 пресинтетическая или поздняя) по признаку чувствительности клеток к содержанию в среде культивирования ростовых факторов.

Не все клетки в организме или при культивировании *in vitro* постоянно находятся в клеточном цикле. В организме большинство терминально дифференцированных клеток необратимо утрачивают способность к делению. Другие клетки прекращают делиться, но под влиянием определенного пролиферативного стимула могут вернуться в клеточный цикл. Такие клетки обычно диплоидны, т.е. выход их из цикла произошел до начала S-фазы. Впервые к выводу о существовании обратимого выхода клеток из цикла пришли L.G. Lajtha и H. Quastler, которые предложили для определения такого состояния клеток использовать термин «фаза G_0 ». Для культивируемых *in vitro* клеток, за исключением сильно малигнизированных, характерно существование определенной доли клеток в G_0 -фазе и это необходимо учитывать при анализе клеточной популяции.

Для определения доли клеток, находящихся в клеточном цикле, т.е. совокупности всех клеток за исключением клеток в G_0 , принято использовать термины «фракция роста» или «пролиферативный пул».

Изучение дифференциальной экспрессии различных белков в ходе клеточного цикла требует получения синхронно делящихся клеток. В естественных условиях синхронно идут несколько первых делений дробления в раннем эмбриональном развитии, при изучении которых и были открыты ключевые регуляторы клеточного цикла, названные циклинами, поскольку уровень этих белков в клетке изменяется циклически.

Наряду с циклинами, сейчас известно несколько семейств белков, количество которых в клетке циклически изменяется. Даже сам термин «циклин» был впервые использован для обозначения белка, по современной номенклатуре к циклинам не относящегося. В настоящее время этот белок называется PCNA (от proliferating cell nuclear antigen).

В отличие от белков, связанных с регуляцией клеточного деления или репликации ДНК, активность синтеза множества других клеточных белков не зависит от стадии клеточного цикла - таковы постоянно необходимые клетке структурные белки цитоскелета – актин или тубулины.

Клеточный цикл первых синхронных делений эмбриональных клеток «неполный» – в нем практически отсутствуют фазы G_1 и G_2 . Вместе с тем, исследования последних лет показали, что некоторые принципиальные события «полного» клеточного цикла соматических клеток - критические точки (по-английски checkpoints) происходят именно в G_1 и G_2 фазах. В частности, точка рестрикции (R point или G_1 restriction point), момент, когда клетка "решает" идти ли ей в следующий цикл, находится во второй половине стадии G_1 .

Формирование митотического аппарата, в частности начало репликации центриолей, и начало расхождения centrosom, будущих полюсов веретена деления в митозе, также может начинаться в конце фазы G_1 и середине фазы G_2 , соответственно.

Таким образом, для понимания процессов регуляции клеточного цикла исследование клеток в G_1 и G_2 фазах имеет первостепенное значение. В случае четкой внутриклеточной локализации, предварительно определить изменение количества белка в клетке можно на основании морфологических исследований. Однако для более точного заключения о зависимости уровня количества белка от стадии клеточного цикла необходим биохимический анализ.

Для количественного анализа экспрессии белков необходимо иметь исследуемые клетки в большом количестве и в виде достаточно чистых популяций, однако, в отличие от клеточных делений раннего эмбрионального развития, культивируемые клетки перевиваемых линий делятся асинхронно. Даже сестринские клетки, появившиеся в результате деления одной материнской, могут значительно отличаться по продолжительности клеточного цикла.

Для анализа продолжительности стадий клеточного цикла применяются различные методы. Поскольку прямое определение стадии клеточного цикла клетки возможно только в митозе (прижизненно или на фиксированных препаратах с помощью микроскопии) и в S-фазе (авторадиографически или иммуноцитохимически по включению предшественников синтеза ДНК), то анализ продолжительности остальных стадий основывается на динамике изменения доли клеток в митозе и S-фазе. Например, для определения продолжительности фазы G_1 клетки после выхода из митоза могут быть прижизненно прослежены (при культивации в среде с BrdU) и зафиксированы через 5-10 часов (в зависимости от типа клеточной культуры), далее время начала включения ими BrdU может быть определено иммуноцитохимически с помощью специфических антител. Для определения продолжительности G_2 -фазы, определяется среднее время появления «меченых митозов» после начала культивации в среде с BrdU (подробнее см далее).

Для определения общей продолжительности клеточного цикла может использоваться прямое прижизненное наблюдение клеток «от митоза до митоза». Однако такая методика не дает возможности исследовать большое количество клеток.

Общую продолжительность клеточного цикла в исследуемой линии можно также определить на основании данных о времени удвоения количества клеток и доле клеток в G_0 -фазе. Проводить эксперименты, связанные с изучением клеточного цикла, рекомендуется не ранее, чем через 48 ч после пересадки клеток, так как до этого времени клеточная популяция еще не вошла в логарифмическую стадию роста, и характеристики роста клеток будут существенно меняться в ходе опыта.

Скорость роста клеточной популяции анализируется по динамике изменения количества клеток на определенной площади (например, среднее количество клеток на одно поле зрения микроскопа), вплоть до момента когда клеточные островки не начнут

смыкаться в монослой, что приводит к существенному контактному торможению пролиферации.

Параллельно необходимо фиксировать одновременно посаженные на стекла клетки, инкубированные в среде с BrdU в течение времени, достаточном для определения доли клеток в G₀-фазе. Среднее время удвоения количества клеток рассчитывается по формуле: $t_d = t / \log_2 (N_t/N_0)$, где t_d - время удвоения количества клеток, t - время между начальным и конечным подсчетами количества клеток, N₀ и N_t - количество клеток в начале и конце эксперимента, соответственно.

Для клеточных культур с низкой долей клеток в G₀-фазе (0-5%) время удвоения незначительно отличается от продолжительности клеточного цикла (если доля клеток в G₀ равна 0, то абсолютно совпадает). Если же доля клеток в G₀ выше, то для подсчета продолжительности клеточного цикла необходимо использовать формулу пересчета: $T = t_d / \log_2 [(2 - y) / (1 - y)]$, где T – продолжительность клеточного цикла, t_d - среднее время удвоения количества клеток и y - доля клеток в G₀-фазе (Узбеков, 2004). Такой анализ позволяет достаточно точно определить среднее значение продолжительности клеточного цикла.

Определение продолжительности S-фазы и всего цикла в одном эксперименте.

Короткая инкубация асинхронной клеточной культуры (15-30 минут) в среде, содержащей BrdU, позволяет определить относительную продолжительность S-фазы в клеточном цикле. При этом необходимо учитывать долю клеток в G₀-фазе и подсчитывать долю клеток в S-фазе, исходя из клеток только пролиферативного пула, величина которого эквивалентна доле клеток включивших BrdU за время инкубации, заведомо превышающее длительность всего клеточного цикла. Для большинства клеточных культур позвоночных доля S-фазы составляет около 40 % от клеточного цикла.

Длительность S-фазы и всего клеточного цикла может быть установлена более точно, если продолжить описанный выше эксперимент и периодически фиксировать клетки, растущие в среде содержащей BrdU. Клетки в культуре делятся асинхронно, поэтому в каждый промежуток времени в S-фазу вступает одинаковое количество новых клеток (отклонения от этой закономерности обсуждаются ниже). Таким образом, выявляя включенный в ДНК BrdU, можно наблюдать прямо пропорциональный рост количества меченых клеток от времени инкубации.

Следует отметить, что в течение первых нескольких часов инкубации клеток в среде с BrdU скорость накопления меченых клеток несколько ниже, чем позднее. Продолжительность этого периода эквивалентна по времени суммарной продолжительности G_2 -фазы и митоза. Дело в том, что пока меченые клетки не прошли митоз, их количество действительно прямо пропорционально времени инкубации с BrdU. Однако, когда клетки, помеченные в конце S-фазы, проходят G_2 -фазу и митоз они, разделившись, дают две меченые клетки из одной. Таким образом, по изменению динамики накопления меченых клеток можно определить суммарную длительность G_2 -фазы и митоза. Однако чаще это делают, определяя не общую долю меченых клеток, а долю меченых митозов (см. далее об измерении продолжительности G_2 -фазы), так как трудно точно определить небольшое изменение скорости накопления меченых клеток за столь короткий период времени. После того, как последние клетки, находившиеся в G_2 -фазе в момент начала инкубации в BrdU пройдут митоз, установится новая скорость накопления меченых клеток, отражающая суммарную динамику процессов вступления новых клеток из G_1 -фазы в фазу S и удвоения количества меченых клеток после митоза.

Далее, в определенный момент времени, скорость роста доли меченых клеток начнет замедляться. Это связано с тем, что в S-фазу начнут вступать клетки уже помеченные в конце S-фазы предыдущего клеточного цикла. Изменение угла наклона кривой на графике будет плавным из-за различий между клетками в длительности S-фазы и всего клеточного цикла. Точка пересечения прямолинейных продолжений среднего и конечного участков графика кривой накопления меченых клеток соответствует продолжительности клеточного цикла за вычетом продолжительности S-фазы – период «Т минус S». В связи с тем, что часть клеток в культуре находится в G_0 -фазе, доля меченых клеток не достигает 100%. С другой стороны, нельзя ожидать полного прекращения роста доли меченых клеток, так как каждая пролиферирующая клетка в условиях нелимитированного роста, как было отмечено ранее, в результате митоза образует две меченых из одной, что снижает общую долю немеченых (неделящихся) клеток вдвое каждый цикл. В свою очередь, этот процесс частично компенсируется выходом части клеток из цикла, что может приводить в течение определенного времени к стабилизации величины пролиферативного пула.

Таким образом, зная долю S-фазы от всего клеточного цикла из первой части эксперимента, и продолжительность периода «Т минус S» из второй части эксперимента, решая систему уравнений, можно вычислить и длительность клеточного цикла (Т) и S-фазы.

Определение продолжительности G₂-фазы клеточного цикла.

Для определения продолжительности G₂-фазы клеточного цикла существует единственный надежный метод, который получил название "метод меченых митозов". В настоящее время, вместо мечения реплицирующейся ДНК ³H-тимидином и последующего выявления меченых клеток автордиографическими методами, используется мечение клеток в S-фазе включением BrdU с последующим выявлением его специфическими антителами. Для того чтобы митоз оказался меченым необходимо, чтобы клетка находилась в S-фазе в момент начала инкубации. Время инкубации, когда появляется первый меченый митоз (точнее первая меченая ранняя профазы митоза), соответствует минимальной продолжительности G₂-фазы. Поскольку для фиксированных клеток невозможно точно определить насколько долго клетка находилась в каждой стадии митоза, то обычно принимают, что она находится в середине данной стадии. Для более точного определения минимальной продолжительности G₂-фазы необходимо также учитывать стадию первых меченых митозов. Например, если через 2 часа инкубации с BrdU была обнаружена меченая клетка в метафазе, то минимальная продолжительность G₂-фазы будет равна двум часам минус продолжительность профазы, прометафазы и половины метафазы. Кроме того, для того чтобы клетка включила BrdU, она какое-то минимальное время должна была находиться в S-фазе. Следовательно, реальная минимальная продолжительность G₂-фазы ещё несколько ниже рассчитанной (обычно этим временем пренебрегают, однако, исходя из вероятности, можно принять это время за половину времени инкубации клеток в BrdU).

По полученным данным строится график зависимости доли меченых митозов от времени инкубации клеток в среде с BrdU. Средним значением длительности G₂-фазы считается то время, когда 50 % митозов оказываются мечеными минус половина длительности митоза. Более точно можно подсчитать среднюю продолжительность G₂, если подсчитывать только процент меченых профаз. В этом случае, средняя

продолжительность G_2 будет равна времени регистрации 50 % меченых профаз за вычетом половины времени профазы.

Максимальная продолжительность G_2 -фазы соответствует времени инкубации, когда обнаруживается последний немеченый митоз за вычетом времени с начала митоза до середины стадии этого митоза. Другим способом можно рассчитать максимальную продолжительность G_2 -фазы, определив минимальное время, когда все митозы оказываются мечеными за вычетом продолжительности митоза.

Определение продолжительности митоза.

Длительность митоза можно оценить, исходя из продолжительности всего клеточного цикла, доли клеток в G_0 -фазе и митотического индекса. Обычно в культивируемых клетках позвоночных митоз длится около 1 ч и составляет 3-5 % от общей продолжительности клеточного цикла.

Продолжительности различных стадий митоза определяется при прямом прижизненном наблюдении клеток. Следует отметить, что нормальное прохождение митоза существенно зависит от температуры, поэтому прижизненные наблюдения необходимо проводить при той же температуре, при которой клетки культивируются.

Определение продолжительности G_1 -фазы клеточного цикла.

Продолжительность G_1 -фазы может быть рассчитана как из данных о длительности остальных стадий клеточного цикла, так и определена экспериментально. Наиболее точный, но и наиболее трудоемкий метод состоит в том, что клетки прижизненно наблюдают различное время после митоза и затем фиксируют, предварительно импульсно (15-30 мин) проинкубировав в среде, содержащей BrdU. Этим способом можно определить как среднее значение длительности G_1 -фазы, так и его вариабельность. Продолжительность G_1 может быть также определена по времени начала включения BrdU клетками, предварительно синхронизованными в митозе.

Определение продолжительности всех стадий клеточного цикла в одном эксперименте.

Суммируя результаты, изложенные выше, можно предложить схему эксперимента, в котором одновременно определяются все параметры клеточного цикла. Для этого асинхронную клеточную культуру инкубируют в среде, содержащей BrdU, периодически фиксируя клетки и окрашивая их антителами к BrdU.

Чтобы определить долю клеток в G_0 -фазе, клетки инкубируют в среде с BrdU в течение времени заведомо большего, чем продолжительность клеточного цикла. Доля клеток, не включивших BrdU, и покажет долю клеток в G_0 -фазе. Длительность S-фазы и всего клеточного цикла определяют из данных о доле клеток в G_0 -фазе, доле меченых клеток в начале опыта и времени точки перегиба (точка «Т минус S») кривой графика накопления меченых клеток. Митотический индекс (доля клеток в митозе) показывает соотношение продолжительности митоза и продолжительности всего клеточного цикла. При этом надо принимать в расчет только клетки пролиферативного пула. Продолжительность G_2 -фазы соответствует времени, когда после инкубации клеток в среде с BrdU половина митозов оказываются мечеными. Продолжительность фазы G_1 определяют вычитанием длительности всех остальных фаз из общей продолжительности клеточного цикла.

Такое исследование продолжительности параметров клеточного цикла предлагается для экспериментальной части задачи.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа №1. Исследование продолжительности стадий клеточного цикла в клетках линии СПЭВ по анализу динамики включения BrdU.

Объект исследования: клеточная линия СПЭВ (эпителиоидная перевивная линия, полученная из почки эмбриона свиньи).

Цель работы: освоение методов анализа клеточного цикла.

Приборы и реактивы: микроскоп, оснащенный оптической системой для наблюдения клеток методом фазового контраста и флуоресценции; культуральная среда 199, эмбриональная сыворотка, антибиотик-антимикотик, стерильная пластиковая посуда для культивирования клеток, стерильные пипетки, BrdU, антитела к BrdU (клон BU-33, Sigma), вторые козы антимышьи антитела, конъюгированные с флуорохромом FITC, физиологический фосфатный буфер PBS, HCl 4 M для гидролиза, стекла предметные и покровные, спирт этиловый 70%, парафильм, фильтровальная бумага, чашки Петри диаметром 40 мм и 100 мм, раствор Mowiol (с 1 мг/мл DABCO и 1 мкг/мл DAPI).

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Пересадить клетки СПЭВ из культуральных матрасов на покровные стекла (**подробнее см. Глава 2, Практическая задача 2**).
- 2) Через 48 ч после начала культивирования клеток сменить в чашках Петри со стеклами старую среду на среду, содержащую BrdU (40мкМ).
- 3) Фиксировать клетки 70% этанолом каждые 0.5 ч в течение 6 часов и далее каждый час в течение по крайней мере 12 часов.
- 4) Фиксировать клетки 70% этанолом после 24-28 ч (каждый час) инкубации в среде с BrdU для определения доли клеток вне цикла (G0-фаза).
- 5) Отмыть клетки на стеклах от фиксатора в 3 сменах PBS (по 10 минут).
- 6) Провести частичный гидролиз ДНК в клетках, проинкубировав их в 4М HCl 20 минут.
- 7) Отмыть клетки от кислоты в 5 сменах PBS (по 10 минут).
- 8) Проинкубировать клетки в 3 % растворе BSA на PBS в течение 30 минут при комнатной температуре на каплях (клетками вниз!) во влажной камере на поверхности парафильма в 100 мм чашках Петри.
- 9) Моноклональные мышинные антитела, специфичные к BrdU (клон BU-33, Sigma), развести в буфере для инкубации (1% BSA на PBS, pH 7,4) в концентрации 1:100.
- 10) Пинцетом перенести стекла с клетками с каплей блокирующего раствора (PBS с 3 % BSA) на капли первых антител (клетками вниз!) и проинкубировать во влажной камере на поверхности парафильма 1 час при комнатной температуре.
- 11) Стекла из влажной камеры перенести (клетками вверх!) в 40 мм чашки Петри с 3 мл буфера для отмывки (1% BSA на PBS). Отмыть в трех сменах буфера по 10 минут в каждой.
- 12) Вторые, связанные с флуорохромом FITC козы антимышинные антитела, развести в буфере для инкубации (1% BSA на PBS, pH 7,4) в концентрации 1:100.
- 13) Пинцетом перенести стекла с клетками из чашек Петри на капли вторых антител (клетками вниз!) и проинкубировать во влажной камере 1 час при комнатной температуре в защищенном от света месте (например, закрыв чашку фольгой).
- 14) Стекла из влажной камеры перенести пинцетом (клетками вверх!) в 40 мм чашки Петри с буфером для отмывки (1% BSA на PBS), отмыть 10 минут. Далее отмыть 2 раза по 10 минут в чистом PBS.

15) Стекла (клетками вверх!), перенести пинцетом на фильтровальную бумагу, далее удалить излишки PBS касанием краем (!) стекла фильтровальной бумаги и положить стекла (клетками вниз!) на каплю (10 мкл) среды заключения (Mowiol, DAPI 1 мкг/мл, DABCO 1мг/мл). Приготовленный препарат подписать, высушить в течение 2-3 часов при комнатной температуре (в темном месте) и хранить в холодильнике при температуре +4°C.

16) Препараты проанализировать, используя флуоресцентный микроскоп с иммерсионными объективами (x63 или x100).

17) На стеклах, зафиксированных в первые 6 часов инкубации с BrdU определить долю меченых митозов (анализировать 100 митозов на точку фиксации). Построить график зависимости доли меченых митозов от времени инкубации с BrdU. Точка на графике, соответствующая 50 % будет соответствовать средней продолжительности G2 фазы клеточного цикла («Метод меченых митозов»).

18) Определить долю ядер, включивших BrdU через 28 часов. Для этого, наблюдая клетки в фазовом контрасте подсчитать сначала все ядра клеток в поле зрения микроскопа, а затем переведя микроскоп в режим наблюдения флуоресценции посчитать на той же площади количество ядер, включивших BrdU, т.е. флуоресцентно меченых. Повторить эту операцию на нескольких полях зрения микроскопа, чтобы проанализировать не менее 1000 клеток. Доля клеток, не включивших BrdU, даст долю клеток в G0 фазе.

19) На клетках, зафиксированных на сроках от 30 мин до 28 час определить долю меченых ядер (анализировать по 500 клеток на точку фиксации). Построить график зависимости доли меченых ядер от времени инкубации с BrdU. Доля меченых клеток на первом стекле будет соответствовать доле клеток в S фазе клеточного цикла (показатель S/T). При расчете не забыть, что часть клеток находится в G0 и долю S нужно рассчитывать для доли клеток (1 минус G0). Точка на графике, соответствующая точке перегиба между начальным отрезком (первые 4-6 часов) и конечным отрезком графика (18-24 часа) будет соответствовать показателю (T минус S). Исходя из знания соотношения S/T и показателя (T минус S), решая систему уравнений находим значения доли (продолжительности) всего клеточного цикла T и фазы S.

20) Определить митотический индекс, который покажет относительную продолжительность митоза по отношению к общей продолжительности клеточного цикла. Для этого проанализировать 1000 клеток. При расчете не забыть учитывать только клетки в цикле (1-G0). Особой внимательности требует учет профаз, которые, иногда, плохо различимы после гидролиза. За точку окончания митоза (телофазы) принять момент смыкания перемычки между дочерними клетками. Более точно можно определить продолжительность митоза с помощью прижизненных наблюдений. В ходе выполнения данной задачи можно, для простоты, принять, что продолжительность митоза составляет 1 час.

21) Исходя из данных о продолжительности G2 фазы (см. пункт 17), всего цикла T, фазы S и митоза находим среднюю продолжительность фазы G1. $G1=T-S-G2-M$. Таким образом средняя продолжительность всех стадий клеточного цикла определена.

Практическая работа №2. Определение продолжительности клеточного цикла для клеток СПЭВ из данных о времени удвоения клеточной популяции и доли клеток в G0 фазе.

Объект исследования: клеточная линия СПЭВ (эпителиоидная перевивная линия, полученная из почки эмбриона свиньи).

Цель работы: освоение методов анализа клеточного цикла.

Приборы и реактивы: микроскоп, оснащенный оптической системой для наблюдения клеток методом фазового контраста и флуоресценции; культуральная среда 199, эмбриональная сыворотка, антибиотик-антимикотик, стерильная пластиковая посуда для культивирования клеток, стерильные пипетки, BrdU, антитела к BrdU (клон BU-33, Sigma), вторые козы антимышьи антитела, конъюгированные с флуорохромом FITC, физиологический фосфатный буфер PBS, HCl 4 M для гидролиза, стекла предметные и покровные, спирт этиловый 70%, парафильм, фильтровальная бумага, чашки Петри диаметром 40 мм и 100 мм, раствор Mowiol (с 1 мг/мл DABCO и 1 мкг/мл DAPI).

Последовательность экспериментальных операций:

1) Пересадить клетки СПЭВ из культуральных матрасов на покровные стекла (**подробнее см. Глава 2, Практическая задача 2**). Часть клеток оставить

культивировать в матрасике в той же плотности, что и в чашках (толщина слоя среды с клетками при рассаживании в чашках и матрасике должна быть одинакова).

2) Через 48 ч после начала культивирования клеток сменить старую среду на среду, содержащую BrdU (40мкМ) и в матрасике и в чашках Петри со стеклами.

3) Подсчитать количество клеток в матрасике на площади около 1 см², отметив эту зону на нижней стороне пластиковой чашки Петри маркером.

4) Подсчитать количество клеток на ранее отмеченной площади через 24 часа.

5) Одновременно с подсчетом клеток в матрасике зафиксировать клетки на стеклах 70% этанолом (после 24 ч инкубации в среде с BrdU).

6) Отмыть клетки на стеклах от фиксатора в 3 сменах PBS (по 10 минут).

7) Провести частичный гидролиз ДНК в клетках, проинкубировав их в 4М HCl 20 мин.

8) Отмыть клетки от кислоты в 5 сменах PBS (по 10 минут).

9) Проинкубировать клетки в 3 % растворе BSA на PBS в течение 30 минут при комнатной температуре на каплях (клетками вниз!) во влажной камере на поверхности парафильма в 100 мм чашках Петри.

10) Моноклональные мышинные антитела, специфичные к BrdU (клон BU-33, Sigma), развести в буфере для инкубации (1% BSA на PBS, pH 7,4) в концентрации 1:100.

11) Пинцетом перенести стекла с клетками с каплей блокирующего раствора (PBS с 3 % BSA) на капли первых антител (клетками вниз!) и проинкубировать во влажной камере 1 час при комнатной температуре.

12) Стекла из влажной камеры перенести (клетками вверх!) в 40 мм чашки Петри с 3 мл буфера для отмывки (1% BSA на PBS). Отмыть в трех сменах буфера по 10 минут в каждой.

13) Вторые, связанные с флуорохромом FITC козы антимышинные антитела, развести в буфере для инкубации (1% BSA на PBS, pH 7,4) в концентрации 1:100.

14) Пинцетом перенести стекла с клетками из чашек Петри на капли вторых антител (клетками вниз!) и проинкубировать во влажной камере 1 час при комнатной температуре в защищенном от света месте (например, закрыв чашку фольгой).

15) Стекла из влажной камеры перенести пинцетом (клетками вверх!) в 40 мм чашки Петри с буфером для отмывки (1% BSA на PBS), отмыть 10 минут. Далее отмыть 2 раза по 10 минут в чистом PBS.

16) Стекла (клетками вверх!), перенести пинцетом на фильтровальную бумагу, далее удалить излишки PBS касанием краем (!) стекла фильтровальной бумаги и положить стекла (клетками вниз!) на каплю (10 мкл) среды заключения (Mowiol, DAPI 1 мкг/мл, DABCO 1мг/мл). Приготовленный препарат подписать, высушить в течение 2-3 часов при комнатной температуре (в темном месте) и хранить в холодильнике при температуре +4°C.

17) Препараты проанализировать, используя флуоресцентный микроскоп с иммерсионными объективами (x63 или x100). Определить долю ядер, включивших BrdU. Для этого, наблюдая клетки в фазовом контрасте подсчитать сначала все ядра клеток в поле зрения микроскопа, а затем переведя микроскоп в режим наблюдения флуоресценции посчитать на той же площади количество ядер, включивших BrdU, т.е. флуоресцентно меченых. Повторить эту операцию на нескольких полях зрения микроскопа, чтобы проанализировать не менее 1000 клеток.

18) Рассчитать время удвоения количества клеток по формуле:

$t_d = t / \log_2 (N_t / N_0)$, где t_d - время удвоения количества клеток, t - время между начальным и конечным подсчетами количества клеток, N_0 и N_t - количество клеток в начале и конце эксперимента, соответственно.

19) Рассчитать среднюю продолжительность клеточного цикла для клеток исследуемой линии в данных экспериментальных условиях по формуле:

$T = t_d / \log_2 [(2-y) / (1-y)]$, где T – продолжительность клеточного цикла, t_d - среднее время удвоения количества клеток и y - доля клеток в G_0 -фазе (доля клеток не включивших BrdU в течение 24-28 часов).

Глава 9. Синхронизация клеток в культуре.

1. Теоретическая часть.

Для получения клеточной популяции, находящейся преимущественно в одной из стадий клеточного цикла, были разработаны различные методы синхронизации клеток. Ниже приведены основные вещества и физические воздействия, которые для этого используются.

Химические вещества, используемые для синхронизации клеток.

Тимидин (thymidine) при избытке в среде культивирования (2-2,5 мМ) увеличивает внутриклеточный пул dTTP примерно в 5 раз и это приводит к ингибированию перехода CDP в dCDP, что вызывает ингибирование репликации ДНК и задержку клеток в S-фазе. Клетки, находящиеся в момент начала инкубации в среде с высоким содержанием тимидина в митозе, в G_2 или в G_1 аккумулируются в ранней S-фазе, а клетки бывшие на этот момент в S-фазе задерживаются в ней. Таким образом, инкубация, соответствующая по времени продолжительности периода «Т минус S» приводит к тому, что в клеточной популяции присутствует две группы клеток: синхронизованные клетки в ранней S-фазе и несинхронизованные клетки в ранней, средней или поздней S-фазе. Для того, чтобы получить более синхронную клеточную популяцию используется «двойной тимидиновый блок». После первой инкубации в среде с тимидином клетки отмывают свежей средой и культивируют в ней время, достаточное для того, чтобы все клетки, накопленные в ранней S-фазе в процессе первого тимидинового блока достигли фазы G_2 (то есть время эквивалентное максимальной продолжительности S-фазы). Поскольку практически для всех клеточных линий суммарная продолжительность G_2 , митоза и G_1 (даже минимальная) превосходит максимальную продолжительность S-фазы, клетки, остановленные в поздней S-фазе первым тимидиновым блоком не успевают за время отмывки дойти до следующей S-фазы. Далее клетки вторично инкубируют в среде с 2-2,5 мМ тимидина в течение времени « G_2 + митоз+ G_1 ». Таким образом, в идеальном варианте все клетки пролиферативного пула будут аккумулированы на границе G_1 - S или в ранней S-фазе. Для более полного и быстрого снятия тимидинового блока рекомендуется после отмывки культивировать клетки в среде с 10-24 μ М дезоксицитидина (**deoxycytidine**).

К недостаткам синхронизации клеток «тимидиновым блоком» можно, в первую очередь, отнести влияние его не только на репликацию ДНК, но и на биосинтез РНК. В связи с этим, не рекомендуется инкубировать клетки в среде с высоким содержанием тимидина более 16 ч, что позволяет использовать это вещество для синхронизации клеток только с относительно коротким клеточным циклом.

Афидиколин (*aphidicolin*) - ингибитор ДНК полимеразы- α применяется для синхронизации клеток в S-фазе в концентрациях 1-10 мкг/мл, обладает относительно низкой токсичностью для клеток и хорошо отмывается. Оптимальная концентрация афидиколина может отличаться для разных клеточных культур. Например, для клеток человеческой меланомы для ингибирования синтеза ДНК до уровня ниже 20 % необходимо использовать концентрацию афидиколина 10 мкг/мл. В то время как для других клеточных линий концентрация 1-3 мкг/мл достаточна для полного подавления синтеза ДНК. Поскольку клетки, находившиеся на момент начала инкубации в S-фазе, задерживаются в продвижении по циклу, для эффективной синхронизации необходима или двойная обработка афидиколином с промежуточной отмывкой клеток в течение времени эквивалентного максимальной продолжительности S-фазы или предварительная синхронизация клеток другим методом, например, сывороточным истощением или изолейциновым голоданием.

Гидроксимочевина (*hydroxyurea*) является ингибитором рибонуклеотид-дифосфатредуктазы, при добавлении в среду культивирования в концентрации 0.5-1 мМ вызывает задержку клеток в ранней S-фазе за счет истощения пула дезоксирибонуклеотидов.

Изолейциновое голодание (*isoleucine deprivation*). Этот метод, разработанный для клеток китайского хомячка CHO, впоследствии был с различной эффективностью опробован для других клеточных культур. Поскольку после переноса в полную среду культивирования клетки вступали в S-фазу примерно через 4 часа, можно заключить, что отсутствие в среде изолейцина блокирует продвижение по клеточному циклу в середине G₁-фазы.

Ингибитор кальпаина (*calpain inhibitor I = ALLN (N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal)* ингибитор цистеиновых и сериновых протеаз включая кальпаин вызывает ингибирование деградации циклинов. В концентрации 40 мкг/мл он

задерживает XL2 клетки в метафазе на несколько часов. При этом веретено деления имеет нормальное строение.

Ловастатин (lovastatin) и его аналог **мевастатин** или **компактин (mevastatin=compactin)** являются ингибиторами 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА (HMG-СoA) редуктазы. Обработка ловастатином задерживает клетки в G_1 -фазе до точки рестрикции. Для синхронизации клеток ловастатин применяется в концентрации 5 μM , однако уже в концентрации 10 μM он может вызывать заметную индукцию апоптоза.

Метотрексат (methotrexate = MTX), аналог тимидина, блокирует тетрагидрофолатредуктазу, которая предотвращает метилирование dUMP тимидилат синтетазо. В концентрациях 0,88-5 μM метотрексат приводит к остановке клеточного цикла и накоплению клеток в G_0/ G_1 . Необходимо отметить, что при синхронизации клеток метотрексатом используемая для их культивации среда не должна содержать тимидина.

Мимозин (mimosine) это редкая растительная аминокислота, являющаяся хелатирующим агентом и предотвращающая образование новых репликативных вилок, ингибируя рибонуклеазредуктазу и вызывая уменьшение пула dATP и dGTP. Мимозин нарушает дезоксирибо-нуклеотидный метаболизм и воздействует, таким образом, на фазу элонгации ДНК. Он используется в концентрациях 200-600 μM для синхронизации клеток в ранней S-фазе.

Нокодазол (nocodazole) (а также два других вещества - **колхицин (colchicine)** и **колцемид (colcemide)**) вместе называемые анти-микротрубочковыми ядами) существенно повышает критическую концентрацию полимеризации тубулина в клетке, что приводит к деполимеризации микротрубочек и блоку митоза. Несмотря на то, что микротрубочки играют важную роль в интерфазных клетках, их деполимеризация не приводит к остановке, по крайней мере, большинства клеток в продвижении по клеточному циклу от G_1 к митозу. Описана только временная задержка клеток в G_2 -фазе клеточного цикла. Даже очень низкие концентрации нокодазола способны останавливать клетки в митозе, поэтому для каждой клеточной линии подбирается минимально достаточная концентрация (обычно 0.1–0.5 $\mu\text{g/ml}$). При длительной инкубации для многих типов клеток обработка нокодазолом может

приводить к переходу клеток в интерфазу без анафазного расхождения хромосом, т.е. к полиплоидизации.

Стаурополин (staurosporine) это алкалоид, который ингибирует циклин-зависимую киназу (cdk), связываясь с белком ретинобластомы. Для синхронизации клеток в G₁-фазе стаурополин применяется в концентрации 100 нМ, но при длительном воздействии это может приводить к апоптозу.

Сывороточное истощение (serum depletion). Для нормального продвижения по клеточному циклу немалигнизированные клетки нуждаются во внешних ростовых факторах. Эти факторы, обычно, содержатся в эмбриональной сыворотке, которая добавляется в среду культивирования. Отсутствие в среде сыворотки приводит к задержке клеток в G₁-фазе или выходу из цикла в G₀-фазу.

Трихостатин А (trichostatin A = TSA), ингибитор деацетилаз гистонов. В концентрациях 0.1-5 мМ обратимо блокирует клетки и в G₁ и в G₂-фазе.

5-флуородооксиуридин (5-fluorodeoxyuridine) ингибирует тимидилат синтазу и блокирует, таким образом, клетки в ранней S-фазе клеточного цикла. Для синхронизации используется в концентрации 0.05 мМ.

Хэксм 768159 (Hoechst 768159 = [2-(4-hydroxytoluene-3-yl)-4,5-dihydro-4-carboxythiazole]) ингибирует пост-трансляционные изменения редкой аминокислоты гипузина (hypusine), в концентрации 40 мМ останавливает клетки в поздней G₁-фазе клеточного цикла.

Циклопирокс оламин (ciclopyrox olamine=CPX) является ингибитором инициации репликации ДНК и блокирует клетки на границе G₁ / S, для синхронизации клеток используется в концентрации 10 мМ.

Этопозид (etoposide = VP16) ингибитор ДНК топоизомеразы 2, являющийся широко распространенным антираковым препаратом, вызывает задержку клеток в S-фазе клеточного цикла и блок на границе G₂/M. Для синхронизации культивируемых *in vitro* клеток он применялся в концентрациях от 0,7 до 10 мМ. Этопозид вызывает специфическую инактивацию киназной активности, связанной с циклином А (CDK2), что приводит к активации S-фазного и G₂/M check-point контроля. При длительной инкубации обработка клеток этопозидом вызывает апоптоз.

Физические методы синхронизации и селективного деления клеток.

Охлаждение клеток замедляет все клеточные процессы и приводит к увеличению процента клеток в G_1 -фазе и их выходу из цикла в G_0 -фазу. Однако при возвращении клеток в нормальные условия культивирования они идут по циклу несинхронно. Таким образом, охлаждение клеток можно использовать для получения популяции клеток в G_0 . Охлаждение также используется для предотвращения выхода в G_1 -фазу при накоплении митотических клеток синхронизованных другими методами.

Разделение центрифугированием (*centrifugal elutriation*) применяется для суспензионных клеточных культур или клеток снятых с подложки. Принцип метода состоит в том, что клетки разделяются по размеру за счет различной плавучей плотности при центрифугировании. Для этого используется специальный ротор центрифуги, оборудованный трубками для протока жидкости. Этот метод позволяет получать лишь клеточные фракции, обогащенные клетками в G_1 , S или G_2 , но не чистые фракции клеток различных фаз клеточного цикла. В комбинации с предварительной химической синхронизацией метод позволяет получать достаточно чистые фракции синхронизованных клеток.

Стряхивание (*shake-off*) митотических клеток достаточно эффективно для клеток существенно теряющих в митозе связь с подложкой культивирования, таких, как, например, мышинные фибробласты. Этот метод применяется после предварительной инкубации клеток в среде с антимитотическими ядами, чтобы повысить процент митозов за счет блока формирования митотического веретена (см. нокодазол). Для эпителиальных клеток метод существенно менее эффективен. Для повышения выхода митотических клеток культивирование ведется в специальных медленно (0.5 об/мин) вращающихся емкостях, которые периодически (каждые 10 мин) вращаются со скоростью 200 об/мин для стряхивания слабо прикрепленных митотических клеток. Для предотвращения выхода в G_1 -фазу накопленных митотических клеток используется их охлаждение. Для лучшего прикрепления интерфазных клеток, емкости для культивирования предварительно обрабатываются ацетатом магния.

Разделение клеток в проточном цитофлуориметре. Принцип метода заключается в автоматизированном разделении клеток, предварительно прижизненно окрашенных флуоресцентными красителями стохиометрически связывающимися с

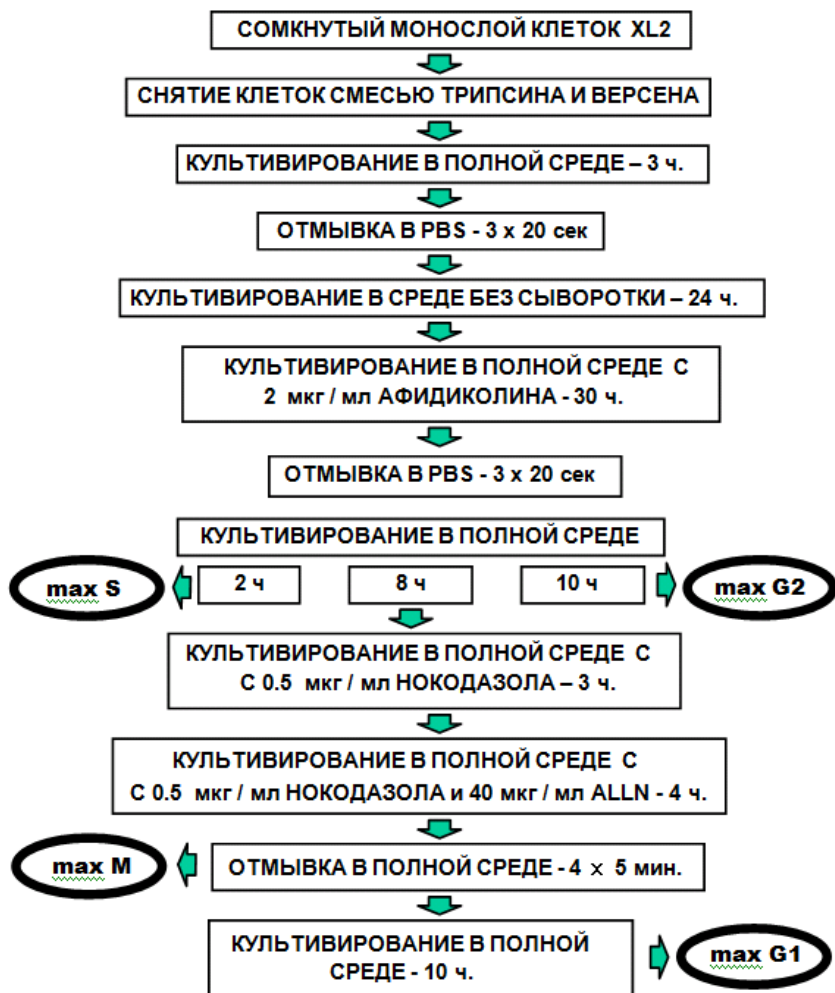


Рис. 1. Схема синхронизации клеток линии XL2 для получения экстрактов из популяций, обогащенных клетками различных фаз цикла. max G1 – популяция клеток с максимальной долей клеток в G₁- фазе клеточного цикла, max S, max G2, max M - в S-фазе, G₂- фазе и митозе, соответственно.

ДНК, например, Hoechst 33342. Недостатки метода аналогичны недостаткам метода разделения клеток центрифугированием - метод не позволяет разделять клетки в G₂-фазе от митотических клеток и тетраплоидных клеток в G₁-фазе.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа. Синхронизация клеток XL2 и получение фракций клеток G₁, S, и G₂ фаз клеточного цикла и митотических клеток.

Цель работы: освоение методов синхронизации клеток.

Практическая задача: получение и исследование фракций клеток G₁, S, и G₂ фаз клеточного и митотических клеток.

Объект исследования: клетки линии XL2 (эпителиоидная перевивная линия, полученная из головастиков шпорцевой лягушки).

Приборы и реактивы: микроскоп, оснащенный оптической системой для наблюдения клеток методом фазового контраста и флуоресценции; культуральная среда L15, эмбриональная сыворотка, антибиотик-антимикотик, стерильная пластиковая посуда для культивирования клеток, стерильные пипетки, BrdU, антитела к BrdU, вторые антитела, конъюгированные с флуорохромом, физиологический фосфотный буфер, HCl 1 M для гидролиза, афидиколин, нокодазол, ALLN, стекла предметные и покровные, спирт этиловый 70%, 3-кратный лизирующий буфер Лемли, специальный пластиковый скребок для соскабливания клеток.

Экспериментальные операции:

- 1) Клетки XL2, выращенные до конфлюэнтного монослоя, снять с помощью смеси трипсина и Версена, ресуспендировать в полной среде и посадить одновременно на пластиковые матрасы и покровные стекла в концентрации 600 клеток / мм².
- 2) Через 3 часа, когда клетки прикрепилась к стеклу, трижды отмыть среду теплым PBS (25°C) и заменить ее средой без сыворотки.
- 3) Через 24 ч культивирования клетки перенести в полную среду с 40 мкМ афидиколина.
- 4) Через 30 ч афидиколин отмыть теплым (25°C) PBS и культивировать клетки в полной среде. Клетки на покровных стеклах фиксировать 70% этанолом одновременно с использованием матрасов для получения экстрактов и дополнительно каждый час после начала отмывки афидиколина.

5) Через 2 ч после отмывки афидиколина зафиксировать стекла с клетками и собрать фракцию клеток с максимальным процентом клеток в S-фазе. Сбор фракций клеток включает в себя следующие операции: удаление верхней крышки культурального матраса, полное удаление культуральной среды с помощью пипетки или водоструйного насоса, добавление 3-кратного лизирующего буфера Лемли, соскабливание клеток специальным скребком, сбор фракции клеток в эппендорф (объемом 1.5 мл), обработка ультразвуком для разрушения ДНК, нагрев (90°C, 5 мин), заморозка и хранение при минус 20°C. Перед тем как использовать фракции для электрофореза, необходимо довести дистиллированной водой конечную концентрацию буфера Лемли до 1 кратного. Желательно также предварительно рассчитать количество клеток во фракции и стандартизовать их по количеству клеток добавлением 1 кратного буфера Лемли, рекомендуемая концентрация 10 000 клеток/мкл конечного объема образца. Для определения количества клеток в матрасе, предварительно измеряют с помощью объект-микрометра диаметр поля зрения инвертированного микроскопа (объектив 20 x), далее рассчитывают площадь поля зрения, видимую в микроскоп через этот объектив, подсчитывают количество клеток в 20 полях зрения на различных участках культурального матраса, рассчитывают общее количество клеток в матрасе, умножая среднее количество клеток в поле зрения на коэффициент пересчета (площадь матраса/площадь поля зрения).

6) Для получения популяции, обогащенной митотическими клетками через 8 ч после начала отмывки афидиколина в среду культивирования добавить нокодазол в конечной концентрации 0.5 мкг/мл, и спустя 3 ч ALLN (40 мкг/мл). После инкубации клеток в среде с нокодазолом и ALLN (4 ч) отмыть их (4 x 5 мин) свежей средой и собрать фракцию обогащенную митотическими клетками.

7) Через 10 ч после отмывки афидиколина зафиксировать стекла с клетками и собрать фракцию клеток с максимальным процентом клеток в G₂-фазе.

8) Фракцию клеток с максимальным процентом в G₁-фазе получить инкубацией клеток в полной среде в течение 10 ч после отмывки смеси нокодазола и ALLN (см. пункт 7).

9) После иммуноцитохимической окраски АТ к BrdU (подробнее об окраске см.

Глава 8) подсчитать процент клеток в S-фазе и митотический индекс (5000 клеток на

точку). Исходя из этих данных рассчитать процентное содержание клеток различных фаз клеточного цикла в собранных фракциях.

10) Факультативно. Исследование с помощью специфических антител концентрации различных белков в клетках на различных стадиях клеточного цикла (электрофорез, перенос на нитроцеллюлозную мембрану, иммунохимическая окраска АТ).

Глава 10. Приготовление хромосомных препаратов и гибридизация *in situ*.

1. Теоретическая часть.

Анализ структуры хромосом имеет огромное значение как в различных разделах фундаментальной науки, так и при решении разнообразных прикладных задач, особенно в медицине. В кариотипе человека хромосомы относительно слабо отличаются друг от друга, тем не менее, на основании простого морфологического анализа все хромосомы могут быть разделены на несколько групп. Однако, для решения многих задач такого простого анализа недостаточно, поскольку требуется идентификация индивидуальных хромосом. Точно идентифицировать все хромосомы кариотипа позволяют методики дифференциального окрашивания. Наиболее простой метод позволяет выявлять районы конститутивного гетерохроматина – участков хромосом сохраняющих конденсированное состояние на протяжении всего клеточного цикла. Этот метод получил название *С-окрашивания* (C-banding). Окрашивание хромосом для выявления гетерохроматических сегментов или С-сегментов включает в себя несколько последовательных обработок (слабой кислотой, щелочью, теплым солевым раствором) и окрашивание красителем Гимзы. Гетерохроматин имеет более плотную структуру и разрушается в результате всех обработок меньше, чем эухроматические районы. Это, по-видимому, и является причиной более интенсивного окрашивания С-сегментов красителем Гимзы. У млекопитающих С-сегменты выявляются в основном в районах центромер, однако для многих организмов (например, растения с большими хромосомами) типичны крупные блоки гетерохроматина в плечах или в теломерных участках хромосом.

Из всех методов дифференциального окрашивания наибольшее распространение имеет метод *G-окрашивания* (G-banding), позволяющий выявить районы хромосом, имеющие различную структуру и биохимическую композицию. В результате окрашивания плечи хромосом выглядят так, как будто они образованы чередующимися светлыми и темными полосами, причем особенности размера и взаимной локализации этих полос позволяют достоверно идентифицировать все хромосомы кариотипа человека и выявить целый ряд хромосомных мутаций. По мере компактизации хромосом отдельные сегменты сливаются друг с другом, и поэтому в слабо конденсированных хромосомах общее число G-сегментов заметно выше, чем в сильно конденсированных. Так, например, общее количество сегментов в нормально конденсированных метафазных хромосомах человека примерно 350, в прометафазных хромосомах можно насчитать до 1000 отдельных сегментов. В избыточно конденсированных (гиперконденсированных) хромосомах четко выявить сегменты в количестве, достаточном для идентификации хромосом, становится невозможным,

поэтому для анализа дифференциального окрашивания хромосом, как правило, выбирают пластинки с относительно слабо конденсированными хромосомами.

Исключительное место в современных цитогенетических и клеточно-биологических исследованиях играет метод *флуоресцентной гибридизации нуклеиновых кислот* (FISH, fluorescent in situ hybridization), основанный на способности комплементарных одноцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот образовывать при определенных условиях прочные двухцепочечные гибриды. Особое место в генетических исследованиях занимает выявление при помощи гибридизации *in situ* разнообразных хромосомных мутаций. Так, например, гибридизация со специфическими районами хромосом позволяет выявлять случаи анеуплоидии. Если в нормальных клетках выявляется две точки, соответствующие гомологичным хромосомам, то в случае триплоидии по данной хромосоме выявляется три точки. Несколько сложнее схема экспериментов тогда, когда надо выявить перестройки хромосом. При этом имеет смысл выявлять только очень небольшое количество перестроек – тех, которые являются характерными для той или иной болезни. Часто перестройки хромосом могут с высокой частотой встречаться в определенном типе опухолей, что помогает в установлении диагноза и назначении схемы лечения.

Отдельный интерес представляют гибридизационные пробы, позволяющие выявить целые хромосомы (*chromosome paints*). Такие пробы можно получить из хромосом, разделенных либо с помощью проточного цитофлуориметра (сортера), либо с помощью методов микродиссекции, причем в последнем случае можно получить пробы и на отдельные районы хромосом. Гибридизационные пробы, выявляющие ту ли иную хромосому или ее участок, широко используют для изучения хромосом в митозе, мейозе и интерфазе, в различных сравнительных эволюционных исследованиях и для выявления транслокаций, в которые вовлечены меченные хромосомы. В частности, с помощью таких проб было продемонстрировано, что отдельные хромосомы в составе интерфазных ядер занимают ограниченные районы – *хромосомные территории*. Причем, если в хромосоме располагается много транскрипционно активных генов, то хромосома будет локализоваться в центральной области ядра, и наоборот, если транскрипционно активных генов в хромосоме мало, то располагаться такая хромосома будет ближе к периферии ядра. Эти и многие другие факты, свидетельствующие о высокой пространственной упорядоченности хромосом и некоторых процессов (транскрипции, процессинга, репликации и т.п.), в настоящее время интенсивно разрабатываются в рамках концепции хромосомных территорий.

Основные этапы получения хромосомных препаратов.

Для анализа структуры хромосом любым из описанных выше методов необходимо использовать специально приготовленные *хромосомные препараты*. Понятно, что при изучении хромосом в интактных митотических клетках, где

хромосомы собраны в компактную метафазную пластинку, различить индивидуальные хромосомы практически невозможно. Кроме того, хромосомы занимают в делящейся клетке довольно большой объем, что делает необходимым проведение 3D-реконструкций. На ранних этапах развития цитогенетики хромосомы изучали именно так, что позволило сделать большое количество важнейших открытий, но это одновременно требовало от исследователя огромного мастерства и невероятной кропотливости. Позднее были разработаны методы, позволяющие разрушить зафиксированную клетку и разбросать хромосомы по поверхности стекла. Получаемые хромосомные препараты позволяют проводить цитогенетический анализ с использованием всего спектра современных методов клеточной биологии.

Существует довольно большое количество вариантов получения хромосомных препаратов, что в первую очередь определяется источником, из которого получен материал. Например, для получения хромосомных препаратов из растений, клетки которых окружены плотной клеточной стенкой, необходимо раздавить зафиксированную ткань под покровным стеклом (*давленные препараты*). Если надо получить очень качественный препарат, то растительная ткань после фиксации обрабатывается растворами ферментов, разрушающих клеточные стенки, и таким образом клетки переводятся в суспензию. Только после этого маленькая капля суспензии накрывается покровным стеклом, производится надавливание, после чего высвобождаются отдельные хромосомы. К технике давленных препаратов приходится прибегать и при работе с политенными хромосомами из слюнных желез двукрылых насекомых. Несколько легче обстоит дело при работе с животными клетками, которые можно перевести в суспензионное состояние еще живыми. Тогда суспензию зафиксированных клеток раскатывают с небольшой высоты на поверхность стекла, при этом клетки разрушаются и хромосомы распределяются по поверхности стекла.

Стандартным источником получения хромосом человека является лимфоциты периферической крови. Обычно изолированные лимфоциты инкубируют в присутствии *митогена*, т.е. вещества стимулирующего выход клеток из G_0 и последующее деление клеток. Активированные таким образом лимфоциты обрабатывают *митостатиком* (нокодазол или колхицин), который разрушает микротрубочки и блокирует клетки в метафазе. Очевидно, что чем длиннее обработка митостатиком, тем больше хромосомных пластинок будет в препарате. Однако, как упоминалось ранее, в течение обработки митостатиком хромосомы продолжают компактизоваться и, соответственно, увеличение количества хромосомных пластинок будет сопровождаться повышением доли пластинок с избыточно конденсированными хромосомами, которые мало подходят для анализа.

Следующий важный этап подготовки хромосомных препаратов – обработка клеток гипотоническим раствором (обычно 0.075 М KCl, что по ионной силе соответствует половине обычного физиологического раствора – 0.14 М NaCl). Гипотоническая обработка имеет несколько эффектов. В частности, во время ее

проведения хромосомы распределяются по всей цитоплазме, что в дальнейшем облегчит разбрасывание по поверхности стекла. Очень важным эффектом является набухание хромосом – при гипотонической обработке хромосомы набухают неравномерно, что в дальнейшем позволяет выявлять различные участки хромосом, такие как G-сегменты.

Сразу после гипотонической обработки хромосомы фиксируют в смеси метанола¹ и ледяной уксусной кислоты. Этот фиксатор приводит к резкой конденсации набухших хромосом, разбросанных гипотонией по цитоплазме. Кроме того, этот фиксатор вымывает значительную часть клеточных компонентов. Удаление цитоплазмы в ходе фиксации является важным этапом получения хорошего хромосомного препарата, т.к. если цитоплазма остается, то хорошо окрасить препарат, как правило, не удастся. Поэтому фиксацию проводят в нескольких сменах фиксатора. После фиксации препарат раскапывают на влажные холодные предметные стекла.

2. Экспериментальная часть.

Практическая работа №1. Приготовление хромосомных препаратов из культивируемых клеток HeLa.

Цель работы: обучение методу получения хромосомных препаратов

Объект исследования: клетки культуры HeLa

Приборы и реактивы: культуральный флакон с культивируемыми клетками; раствор нокадазола; раствор Хенкса; свежеприготовленный раствор трипсина-версена; 0.075 М раствор KCl; свежеприготовленный фиксатор (этанол-уксусная кислота в объемном соотношении 3:1; центрифужные пробирки объемом 15 мл; тщательно промытые в дистиллированной воде покровные стекла, охлажденные до +4°C; краситель Гимзы; буфер Зеренсена (pH 7.0); заливочная смесь DePex; фазово-контрастный микроскоп, оборудованный объективами 10x и 40x.

Последовательность экспериментальных операций:

Поскольку препарат будет приготовлен из клеток, растущих на поверхности пластика, а не в суспензии, клетки, обработанные нокадазолом, необходимо перевести в суспензию. Делается это с помощью смеси трипсина и версена, сходно с тем, как клетки снимают с поверхности культурального флакона при их культивировании.

¹ Хорошие результаты можно получить также и при использовании этанола.

- 1) За 1-2 часа до приготовления препаратов в среду культивирования добавляют раствор нокодазола¹ до конечной концентрации 0.1 мкг/мл (можно использовать и другие митостатики, например, колцемид или колхицин).
- 2) Для приготовления одного десятка хромосомных препаратов достаточно одного культурального флакона объемом 75 мл с культивируемыми клетками. После того как среда слита, клетки аккуратно промывают раствором трипсин-версена, и инкубируют во второй смене (все расворы сливают и наливают по крышке флакона, а не по его дну, где растут клетки, чтобы не смыть и не удалить метафазы, которые прикреплены к поверхности пластика слабее, чем интерфазные клетки). Когда клетки ошариваются их стряхивают с пластика.
- 3) Суспензию клеток в растворе трипсин-версена сливают в пробирку на 15 мл, клетки центрифугируют 5 мин при 500g, заменяют раствор версена на раствор Хенкса (обязательно нагретый до 37°C) и центрифугируют повторно.

Процедура замены раствора в пробирке после центрифугирования требует особого внимания. После того как удаляемый раствор вылит осадок клеток необходимо ресуспензировать в остатке жидкости, каким бы маленьким не было ее количество. Для этого пробирку закрывают, держа ее за крышку одной рукой, и несколько раз встряхивают резкими ударами пальцев второй руки по донышку. Если клетки не ресуспензировать, то они агрегируют. Только после этого, при постоянном встряхивании пробирки, вносится следующий раствор².

- 4) После центрифугирования раствор Хенкса сливают не полностью. Должен остаться небольшой объем (менее 0.5 мл) в котором осажденные клетки ресуспензируются встряхиванием. После этого добавляют, постоянно перемешивая, 10 мл 0.075 М раствор KCl. Гипотонический раствор обязательно должен быть нагрет до 37°C. Общее время гипотонической обработки 5-15 мин (включая центрифугирование). Во время гипотонической обработки хромосомы сначала деконденсируются, а затем постепенно конденсируются. Причем, конденсация происходит дифференцированно, сначала конденсируется материал G-сегментов. Надо учитывать, что разные клетки имеют разную устойчивость к действию гипотонического раствора, что в первую очередь касается трансформированных клеток.
- 5) Гипотонический раствор сливают, и клетки ресуспензируют в его остатках. После этого при постоянном помешивании по каплям добавляют 10 мл свежеприготовленного фиксатора (метанол-уксусная кислота в объемном соотношении 3:1). Фиксатор должен быть предварительно охлажден до -20°C. Фиксируют 15 мин в холодильнике на -20°C.

¹ Стоковый раствор нокодазола готовят на DMSO; наиболее удобна для последующей работы концентрация 1 мг/мл.

² Такой схемы смены растворов следует придерживаться всегда, кроме случаев, когда необходимо сформировать плотный осадок.

- 6) Клетки центрифугируют, сливают фиксатор и добавляют новый. Процедуру повторяют минимум четыре раза (если вокруг хромосом на готовом препарате остаются остатки цитоплазмы, то количество смен фиксатора можно увеличить до шести).
- 7) Суспензию вновь центрифугируют, сливают фиксатор и добавляют примерно 0.20 мл нового фиксатора, чтобы получилась слегка мутная суспензия.
- 8) Суспензию раскапывают на покровные стекла¹. Для получения хороших препаратов абсолютно необходимо отмыть стекла в концентрированной серной кислоте. После того как стекла вымыты, их помещают в стакан или бюкс с дистиллированной водой, который ставят в холодильник. После того, как стекла охладятся, их достают по одному из стакана, аккуратно удаляют избыток воды и быстро капают на стекло небольшое количество суспензии клеток в фиксаторе.
- 9) Просмотр препаратов в режиме фазового контраста, позволяет убедиться в том, что плотность клеток не слишком велика и не слишком низка. В первом случае необходимо разбавить суспензию, во втором - отцентрифугировать и ресуспензировать клетки в меньшем объеме фиксатора. Приготовленные препараты необходимо высушить в течение суток.
- 10) Препарат окрашивают красителем Гимзы. Для окрашивания хромосом используют 4% краситель на фосфатном буфере Зеренсена рН 7.0 (Приложение).
- 11) Препараты промывают в проточной воде, высушивают, промывают в толуоле или ксилоле и заключают в DePeX.

Митотические хромосомы представляют собой палочковидные структуры разной длины и примерно одинаковой толщины (рис.). В месте прикрепления микротрубочек хромосома несколько утоньшается – эту зону называют *первичной перетяжкой* или *центромерой*. В центромерных районах располагаются кинетохоры к которым в метафазе и анафазе прикрепляются микротрубочки митотического веретена. Центромера делит хромосомы на два плеча. Каждое плечо заканчивается участком, имеющим особые свойства, называемом теломерой. Разделение хромосомы на две хроматиды хорошо заметно на стадии поздней метафазы, когда хроматиды остаются связанными только в области центромеры.

Наиболее простыми характеристиками хромосом являются их длина и центромерный индекс (отношение длины короткого плеча к длине длинного плеча), характеризующий положение центромеры. Так, хромосомы с практически равными плечами называют метацентрическими хромосомами; с плечами неодинаковой длины

¹ Очень часто суспензию хромосом раскапывают на предметные стекла. Это удобно только при использовании классических цитогенетических методов окрашивания хромосом. Для проведения иммуноцитохимии, гибридизации *in situ* и т.п. удобнее работать с покровными стеклами.

– субметацентрическими; если одно из плеч очень маленькое, плохо заметное, такую хромосому называют акроцентрической. Однако отличить все хромосомы, основываясь на таких простых признаках, не всегда возможно.

Практическая работа №2. Выявление продольной дифференцированности хромосом клеток культуры HeLa с помощью G-метода.

Цель работы: обучение методу дифференциальной окраски хромосом

Объект исследования: клетки культуры HeLa

Приборы и реактивы: покровные стекла с раскапанными на них хромосомными препаратами; свежеприготовленный раствор трипсина на PBS; краситель Гимзы; буфер Зеренсена (рН 7.0); заливочная смесь DePeX; фазово-контрастный микроскоп, оборудованный объективами 10x, 40x и 100x.

Последовательность экспериментальных операций:

Наиболее популярной методикой для окрашивания хромосом для получения G-сегментирования является метод окрашивания красителем Гимза после обработки трипсином. Наиболее сложным моментом в данной методике является подбор условий обработки трипсином. Рабочие качества трипсина сильно зависят как от самого трипсина, так и от чувствительности хромосом. Пользоваться можно трипсином любой фирмы, однако в каждом конкретном случае время обработки следует подбирать отдельно.

- 1) Препараты обрабатывают трипсином в течении примерно 30 сек, для чего на препарат наносят несколько капель свежеприготовленного раствора трипсина на фосфатно-солевом буфере (PBS). Концентрацию трипсина и время обработки подбирают эмпирически.
- 2) Стекла промывают в дистилляте.
- 3) Окрашивают красителем Гимза. Для окрашивания хромосом используют 4% краситель на фосфатном буфере Зеренсена рН 7.0.
- 4) Препараты промывают в проточной воде, высушивают, промывают в толуоле или ксилоле и заключают в DePeX.
- 5) Препараты изучают под иммерсией. Если хромосомы избыточно гидролизованы ферментом, то надо сильнее развести трипсин, если сегментирование выявляется с трудом – приготовить более концентрированный раствор.

Глава 11. Выявление активных ядрышковых организаторов.

1. Теоретическая часть.

Район ядрышкового организатора – участок хромосомы, содержащий последовательности ДНК, кодирующие рибосомную РНК. Гены рибосомной РНК относятся к повторяющимся последовательностям генома. Так, у человека на диплоидную клетку приходится около 400 последовательностей. Эти гены собраны в нескольких строго определенных локусах на хромосомах: например, у человека они располагаются на коротком плече акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21 и 22. Однако в норме из 10 имеющихся в диплоидной клетке человека ядрышковых организаторов активны не более 7-8. Таким образом, существует некоторый резерв рибосомальных генов, позволяющий при необходимости резко увеличить продукцию рРНК.

Рибосомная РНК является составляющей частью белок-синтезирующих органелл клеток – рибосом. Отсюда очевидно, что изменение активности продукции рибосомной РНК может служить индикатором общей транскрипционной активности клетки. Синтез рибосомной РНК происходит в течение всей интерфазы. Количество ядрышек, как правило, меньше, чем количество активных ядрышковых организаторов, что объясняется ассоциацией отдельных ядрышковых организаторов различных хромосом в интерфазном ядре (*ядрышковая ассоциация*).

Существуют два основных подхода к выявлению ядрышковых организаторов. Первый способ – выявление рибосомных генов с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ*. Приложение этого подхода к хромосомным препаратам позволяет установить общее количество ядрышковых организаторов и их локализацию. Однако большую информацию способен дать метод выявления ядрышковых белков. Многие из белков, вовлеченные в процессы синтеза или процессинге рРНК, хорошо охарактеризованы и к ним имеются антитела, что позволяет использовать для характеристики ядрышек иммуноцитохимические методы. Не меньший интерес представляет *метод серебрения активных ядрышковых организаторов*, заключающийся в обработке в определенных условиях фиксированных клеток нитратом серебра. При этом серебро специфично

восстанавливается рядом ядрышковых белков, которые называют на этом основании *аргентофильными*. Явление окрашивания белков солями серебра называют *аргентофилией*. Реакция серебрения проводится в строго контролируемых условиях, при этом интенсивность окрашивания и структура ядрышек, выявленная серебрением, позволяют судить об общем уровне транскрипционной активности клетки. Например, клетки активно пролиферирующих опухолей содержат повышенное содержание аргентофильных белков.

Некоторые из аргентофильных белков остаются связанными с рибосомными генами и при переходе клетки в митоз, когда синтез РНК прекращается, что позволяет установить, какие из ядрышковых организаторов были активны в предшествующей интерфазе. Т.е. если в ядрышковом организаторе в течении интерфазы транскрипция рибосомальных генов не происходила, то этот организатор в метафазе серебриться не будет. Например, в сперматогенезе и оогенезе изменения в окрашивании ядрышковых организаторов солями серебра хорошо коррелируют с изменениями в синтезе РНК. В частности, у *Xenopus laevis* аргентофильные белки начинают выявляться в ядрышковых организаторах только на той эмбриональной стадии, когда начинается транскрипция рибосомных генов.

2. Экспериментальная часть.

Процедура серебрения активных ядрышковых организаторов.

В цитологических и гистологических работах серебрение используется как метод, которым в зависимости от условий проведения реакции можно специфично окрасить разные структуры – ядрышки, кинетохоры, хромосомный скэффолд, границы клеток в эпителиях и т.п. В настоящее время серебрение широко используется также и в качестве метода окрашивания белков при проведении электрофореза.

В ходе выполнения задач настоящего практикума будет использоваться метод серебрения, описанный в работе Howell, Black (1980). В нем используются два раствора, которые смешиваются непосредственно перед применением. Первый раствор – нитрат серебра в деионизированной воде. Метод импрегнации серебром выдвигает повышенные требования к чистоте используемой посуды и реактивов. Если используется посуда из лабораторного стекла, то для успешного проведения реакции

посуда должна быть вымыта в концентрированной серной кислоте или в бихромат-серной кислоте (хромпике). Если используется пластиковая посуда, то пластик должен быть новым, а растворы серебра должны готовиться непосредственно перед применением. Соли серебра восстанавливаются под действием света, поэтому важно, чтобы все емкости, содержащие их, были завернуты в фольгу или черную бумагу.

Практическая работа №1: Выявление активных ядрышковых организаторов в хромосомных препаратах.

Цель работы: обучение методу выявления активных ядрышковых организаторов выделенных хромосом.

Объект исследования: клетки культуры HeLa.

Приборы и реактивы: покровные стекла с подготовленными хромосомными препаратами; чашки Петри диаметром 40 мм для промывки стекол; чашки Петри диаметром 90 мм для приготовления влажных камер; парафильм; 50 % раствор AgNO_3 в деионизированной воде; раствор 2% желатина в 1% растворе муравьиной кислоты; краситель Гимзы; 0.1 М фосфатный буфер Зеренсена (pH 7.0); ксилол (или толуол); заливочная смесь DePex; фазово-контрастный микроскоп, оборудованный объективами 10x, 40x, 100x.

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Приготовление хромосомных препаратов как описано в Главе 10 (Практическая работа №1). От долгого хранения препараты портятся, поэтому наилучшее качество окрашивания достигается, если проводить серебрение на следующий день после раскапывания суспензии клеток на стекла.
- 2) Стекла помещают в чашки Петри диаметром 40 мм (так, чтобы препарат хромосом оказался сверху) вверх и промывают минимум в трех сменах деионизированной воды по 3-5 минуты в каждой. Важно помнить, что промывку необходимо производить в новой пластиковой чашке Петри (или другой чистой емкости).
- 3) Готовят влажную камеру.
- 4) В двух пробирках или эппендорфах готовят два красящих раствора.

Раствор 1 – 50 % раствор AgNO_3 в деионизированной воде. Если реакция ставится в течение дня несколько раз, можно приготовить несколько эппендорфов с небольшими навесками, к которым перед непосредственно перед использованием

добавлять необходимое количество деионизированной воды. При взвешивании нельзя пользоваться металлическими шпателями. Как уже упоминалось, нитрат серебра в растворе восстанавливается до металлического серебра на свету, поэтому пробирки следует обернуть фольгой или темной бумагой.

Раствор 2 – 2% желатина в 1% растворе муравьиной кислоты. Растворение желатины требует определенного времени, чтобы ускорить процесс, можно поставить приготавливаемый раствор в термостат на 37°C.

- 5) На парафилм во влажной камере наносят равные объемы (примерно по 25-30 мкл, если используется покровные стекла 24×24 мм) каждого из приготовленных растворов. Покровное стекло с раскапанными хромосомами достают из деионизированной воды пинцетом, кладут нижней стороной на кусочек чистой фильтровальной бумаги с тем, чтобы удалить капли воды; касаясь ребром стекла фильтровальной бумаги, по возможности удаляют жидкость и с поверхности стекла, на которой находятся хромосомы. Затем стеклом с препаратом накрывают каплю подготовленного красителя.
- 6) Окрашивание производят во влажной камере в защищенном от света месте. Температуру окрашивания подбирают эмпирически, оптимальные результаты получают при температуре 37°C. Окрашивание завершают, когда препарат приобретет темно-коричневый цвет (ориентировочно: 1-2 минуты при 60°C, 10-12 минут при 37°C).
- 7) Стекла возвращают в чашки Петри и промывают препараты в нескольких сменах деионизированной воды.
- 8) Для того, чтобы лучше выявить структуру хромосом, препараты можно докрасить красителем Гимзы. Время окрашивания и концентрацию красителя следует подбирать отдельно, используя для этого самые плохие препараты. Обычно хорошие результаты получаются при использовании 4% раствора красителя на 0.1 М фосфатном буфере Зеренсена, pH 7.0 (Приложение №). Время окрашивания примерно 3 минуты. Затем стекла промывают проточной водой и переносят в дистиллят.
- 9) Стекла с окрашенными препаратами высушивают при комнатной температуре, быстро промывают в ксилоле или толуоле и заключают в DePeX.

- 10) На правильно окрашенном препарате ядрышки и районы ядрышковых организаторов должны иметь темно-коричневый или черный цвет, тела хромосом – светло-желтый или, если проводили докрасивание хромосом красителем Гимзы, – голубой.

Практическая работа №2: Выявление активных ядрышковых организаторов в культивируемых клетках.

Цель работы: обучение методу выявления активных ядрышковых организаторов в клетках.

Объект исследования: клетки культуры HeLa.

Приборы и реактивы: буфер PBS (рН 7,4), клетки культуры ткани HeLa на покровных стеклах, свежеприготовленный раствор параформальдегида (3,7%); чашки Петри диаметром 40 мм для промывки стекол; чашки Петри диаметром 90 мм для приготовления влажных камер; парафильм; 50 % раствор AgNO_3 в деионизированной воде; раствор 2% желатина в 1% растворе муравьиной кислоты; этанол (50%, 70%, 80 % и 96%); ксилол (или толуол); заливочная смесь DePex; фазово-контрастный микроскоп, оборудованный объективами 10x, 40x, 100x.

Последовательность экспериментальных операций:

- 1) Клетки фиксируют формальдегидом, пермеабилзируют и отмывают в PBS, как это описано в **Главе 5**.
- 2) Стекла помещают в новые пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм клетками вверх и промывают минимум в трех сменах деионизированной воды по 3-5 минуты в каждой.
- 3) Готовят влажную камеру (см. Глава 5). Необходимо обратить особое внимание на то, чтобы не испачкать парафильм.
- 4) В двух пробирках или эппендорфах готовят два красящих раствора.

Раствор 1 – 50 % раствор AgNO_3 в деионизированной воде. Если реакция ставится в течение дня несколько раз, можно приготовить несколько эппендорфов с небольшими навесками, к которым перед непосредственно перед использованием добавлять необходимое количество деионизированной воды. При взвешивании нельзя пользоваться металлическими шпателями. Как уже упоминалось, нитрат серебра в растворе восстанавливается до металлического

серебра на свету, поэтому пробирки следует обернуть фольгой или темной бумагой.

Раствор 2 – 2 % желатина в 1 % растворе муравьиной кислоты. Растворение желатины требует определенного времени, чтобы ускорить процесс, можно поставить приготовляемый раствор в термостат на 37°C.

- 5) На парафильм во влажной камере наносят равные объемы (примерно по 15-20 мкл, если используется покровные стекла 12×12 мм) каждого из приготовленных растворов. Покровное стекло с зафиксированными клетками достают из деионизированной воды пинцетом, кладут нижней стороной на кусочек чистой фильтровальной бумаги с тем, чтобы удалить капли воды с одной поверхности стекла; касаясь ребром стекла фильтровальной бумаги, по возможности удаляют жидкость и с поверхности стекла, на которой находятся клетки. Затем стеклом с препаратом накрывают каплю подготовленного красителя.
- 6) Окрашивание производят во влажной камере в защищенном от света месте. Температуру окрашивания подбирают эмпирически. Наиболее быстро реакция проходит при 60°C, однако очень хорошо реакция проходит и при температуре 37°C. Окрашивание завершают, когда препарат приобретет темно-коричневый цвет (ориентировочно: 10 минут при 37°C).
- 7) Стекла возвращают в чашки Петри и промывают препараты в нескольких сменах деионизированной воды.
- 8) Проводят заключение в синтетическую среду типа DePeX. Стекла с окрашенными препаратами обезвоживают в серии спиртов (50%, 70%, 80 % и две смены 96% этанола), промывают в ксилоле или толуоле и заключают в DePeX. (Подробнее эта процедура описана в Задаче №).
- 9) На правильно окрашенном препарате ядрышки и районы ядрышковых организаторов в митотических клетках должны иметь темно-коричневый или черный цвет, нуклеоплазма интерфазных ядер – светло-желтый, цитоплазма – едва заметный желтоватый оттенок. Структурно интерфазные ядрышки представляют собой скопление маленьких округлых гранул. Поскольку размер окрашенных серебром областей увеличивается в ходе окрашивания, при слишком длительном окрашивании отдельные гранулы могут сливаться, в результате число их может оказаться заниженным.

Глава 12. Трансформация эукариотических клеток

1. Теоретическая часть.

Для исследования функциональной роли, пространственной организации и динамики различных клеточных компонентов важное значение имеет возможность направленно изменять геном клетки. Например, введение мутантных генов и экспрессия белков с измененной структурой могут быть использованы для анализа роли конкретных белков в клеточной физиологии. Использование генетически кодируемых молекулярных маркеров позволяет исследовать внутриклеточную локализацию белков-мишеней непосредственно в живых клетках. Большой популярностью в качестве таких меток в настоящее время пользуются конструкции на основе зеленого флуоресцентного белка (GFP), впервые выделенного из клеток медузы, и его синтетических аналогов. Наиболее естественным способом введения таких меченых белков в клетку является **трансфекция** (перенос) в нее нуклеиновых кислот, кодирующих соответствующие белки. В результате трансфекции происходит временное или постоянное изменение генетического аппарата клетки, получившее название **трансформация**.

В качестве материала для трансфекции может использоваться как РНК, так и ДНК. Благодаря более высокой устойчивости и возможности получения стабильно трансформированных клеток, большее распространение получила трансфекция плазмидной ДНК. Плазмиды для трансформации эукариотических клеток, помимо генетических элементов, необходимых для размножения плазмиды в бактериях, содержат ген, кодирующий исследуемый белок, а также гены, обеспечивающие селективную устойчивость трансфицированных клеток к какому-либо антибиотику, если задачей стоит получение стабильных трансформантов.

Размеры плазмидной ДНК (10^3 - 10^4 пар оснований в длину, гидродинамический диаметр превышает 100 нм) и отрицательный заряд молекулы препятствуют ее спонтанному проникновению в клетку. Кроме того, эндонуклеазы, которые присутствуют на внешней поверхности клетки, разрушают свободную ДНК в течение 30 минут. Первоначально, для преодоления этих ограничений использовали преципитацию ДНК в растворе фосфата кальция. Связывание ДНК с ионами Ca^{++} частично нейтрализует ее отрицательный заряд, а копреципитация ДНК с $Ca_3(PO_4)_2$ приводит к образованию компактных частиц, проникающих через плазматическую

мембрану. Для более эффективной трансфекции в настоящее время разработаны методы, основанные на формировании комплексов ДНК с поликатионными липидами.

Основными компонентами катионного липида являются: гидрофильный липидный «якорь», линкерный участок и положительно заряженная «голова». В состав липидного «якоря» входят либо остатки жирных кислот (чаще всего олеиновой или миристиновой), либо стерольные группы. Состав липидного «якоря» определяет параметры формируемого в комплексе с ДНК липидного бислоя такие, как гибкость и скорость обмена липидов. Линкерная группа определяет химическую стабильность, способность к био-деградации и эффективность трансфекции данным липидом. Биодegradируемые липиды могут быть метаболизированы ферментами клетки, что уменьшает токсичность этих липидов для клетки. Положительно заряженная «голова» взаимодействует с отрицательно заряженной ДНК и, соответственно, участвует в образовании липосом. «Головной» участок различается по структуре в разных липидах и может нести одиночный или более высокий положительный заряд, в зависимости от присутствия первичных, вторичных, третичных и четвертичных аминов. Выпускают коммерческие поликатионные липиды для трансфекции – унифектин (“Unifect”), LIPOFECT AMINE (“Gibco”), ExGENE 500 (Euromedex) , FuGENE 6 (“Roche”).

2. Экспериментальная часть.

Методы трансформации эукариотических клеток.

Размер и стабильность комплекса ДНК и поликатионного липида определяет отношение зарядов в молекулах липида и ДНК, но не состав липида. Следует избегать соотношения зарядов 1:1, так как в этом случае формируются крупные агрегаты (более 1 мкм). Комплексы с суммарными положительными и отрицательными зарядами представляют собой структуры с различными способами расположения ДНК и липидов. В случае суммарного положительного заряда образуются везикулы с диаметром 300-700 нм и трансфекция происходит более эффективно. Добавление ДНК к липиду увеличивает размер формирующихся везикул. Добавление липидов к ДНК не приводит к такому увеличению до тех пор,

пока положительный заряд липидов превышает отрицательный заряд ДНК (Kennedi et al., 2000).

Изначально реагенты для трансфекции берутся в соотношении - 3 положительных заряда поликатионного липида к 1 отрицательному заряду ДНК. Далее, оптимальное соотношение концентраций поликатионного липида и ДНК подбирается экспериментально.

Комплексы ДНК с липидами могут взаимодействовать с компонентами среды, сыворотки, внеклеточного матрикса и т. д. Компоненты сыворотки могут вызывать преждевременное освобождение ДНК из комплекса и усиливать ее деградацию нуклеазами. Помимо этого, бычий сывороточный альбумин, липопротеин, макроглобулин могут также влиять на размер везикул. Поэтому образование комплексов желательно проводить в среде без сыворотки (Zelphati et al., 1998).

Агрегация ДНК с поликатионным липидом происходит быстро, а менее чем через 24 часа комплекс теряет активность. Для продления жизни комплексов используют полиэтиленгликоль, который включают в состав везикул. Содержащие полиэтиленгликоль везикулы не агрегируют и не взаимодействуют с компонентами сыворотки, что увеличивает их стабильность (Hong et al., 1997; Meyer et al., 1998; Mok et al., 1999) .

Цель работы: овладение навыками трансфекции эукариотических клеток.

Практическая задача: трансфекция клеток СПЭВ плазмидами, кодирующими GFP-ламин А.

Объект исследования: клеточная линия СПЭВ (эмбриональный почечный эпителий).

Приборы и реактивы: флуоресцентный микроскоп, ламинарный бокс, пластиковая посуда, культуральная среда 199, сыворотка КРС, антибиотик-антимикотик (Sigma), автоматические микропипетки (1000, 200 и 10 мкл), плаزمида, Унифектин.

Последовательность экспериментальных операций:

Трансфекция эукариотических клеток Унифектином 56TM

1) Накануне трансфекции клетки засевают на 35 – мм чашки в количестве $1-3 \times 10^5$ в 3 мл соответствующей ростовой среды. Клетки выращивают до достижения 60-80% конфлюентности.

- 2) 8 мкл Унифектина разбавляют в 100 мкл бессывороточной среды в микропробирке. Важно добавлять унифектин непосредственно в среду, избегая попадания на стенки пробирки.
- 3) В отдельной микропробирке развести 2 мкг ДНК в 20 мкл бессывороточной среды или ТЕ-буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0).
- 4) По каплям добавить разведенный раствор Унифектина к раствору ДНК. Пипетировать 2 раза. Инкубировать 15 минут при комнатной температуре.
- 5) Добавить 80 мкл среды к раствору ДНК/Унифектина.
- 6) По каплям добавить раствор к клеткам в чашке Петри. Аккуратно перемешать раствор в чашке круговыми движениями.
- 7) Инкубировать клетки при 37° С в СО₂ инкубаторе, не меняя среду.
- 8) Анализировать клетки или клеточные экстракты для определения эффективности трансфекции через 16-72 часа.
- 9) Для получения стабильных трансфектантов через 48-72 часа после трансфекции клетки рассаживают в соотношении 1/5-1/10 на селективной среде.

Трансфекция клеток с использованием Са-фосфатного метода.

Для 35 мм чашки Петри:

Раствор А:

7.5 мкл плазмидной ДНК (концентрация ДНК 0.5 мкг/ мкл в ТЕ)

17.5 мкл 2М СаСl₂

117.5 мкл 0.2 x SSC

Раствор Б:

137 мкл 2 x HEBS

- 1) Подготовить растворы А и Б.
- 2) Смешать содержимое пробирок, чтобы образовался преципитат.
- 3) Добавить содержимое пробирки в чашку Петри к клеткам.
- 4) Инкубировать клетки с преципитатом в термостате в течение 4 часов.
- 5) Промыть клетки средой без сыворотки.
- 6) Добавить в чашку 15% глицерин в 1 x HEBS на 4 минуты.
- 7) Промыть клетки средой без сыворотки.
- 8) Инкубировать клетки при 37° С в СО₂ инкубаторе, не меняя среду.

9) Анализировать клетки или клеточные экстракты для определения эффективности трансфекции через 16-72 часа.

Буферы:

20 x SSC:

3 M NaCl	87.66 г
0.3 M $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 5.5\text{H}_2\text{O}$	53.57 г
дист. H_2O	до 500 мл

2 x HEBS:

NaCl -	8 г
KCl -	0.38 г
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	0.19 г
Глюкоза	1 г
HEPES	5 г

pH 7.05 ± 0.05 (с NaOH)