

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК СУСПЕНЗИИ SOLANUM TUBEROSUM

В настоящее время наряду с традиционными методами исследования растений *in vivo* широко применяются методы, основанные на использовании культивируемых *in vitro* тканей и клеток растений [1, 2]. Эта экспериментально созданная система позволяет в строго контролируемых условиях, на клеточном уровне быстрее и глубже изучать такие сложные процессы, как рост, клеточная дифференциация и развитие растительного организма, основные закономерности первичного и вторичного метаболизма, а также влияние различных экстремальных и вредных воздействий. Многочисленные данные показывают, что в целом ряде случаев культивируемые клетки сохраняют способность и специфичность ответа как на детерминантной, так и на экспрессивной фазах фитоиммунитета. Это позволяет использовать культуры клеток *in vitro* для исследования биохимических и молекулярных механизмов взаимодействия партнеров при патогенезе. Преимуществом культивируемых клеток является возможность изучения непосредственного влияния метаболитов патогена на клетки растения-хозяина [3, 4].

В последнее время культуры клеток и тканей растений широко используются как в фундаментальных исследованиях для изучения различных аспектов биологии растений, так и с целью практического применения клеточных техноло-

гий в медицине, сельском хозяйстве и промышленности.

Важной характеристикой для выяснения эффективности функционирования клеточных культур является оценка плотности их суспензий, которая определяется как количество клеток в единице объема культивируемой суспензии. Наиболее часто используемыми методами оценки плотности клеток в суспензии являются методы, основанные на микроскопировании материала. Предварительно суспензионную культуру подвергают мацерации для получения однородной, состоящей преимущественно из одиночных клеток суспензии. Время мацерации и температурный режим подбирается для суспензии с учетом степени агрегированности и физиологического состояния клеток. Подготовленные клетки считают под микроскопом в специальных камерах (камера Горяева или гемоцитометр Фукса-Розенталя). Однако существенным недостатком метода является то, что он довольно трудоемкий и малодостоверен при характеристике высоко агрегированных клеточных культур.

Для количественного или полуколичественного определения плотности суспензии клеток нельзя полагаться на какой-нибудь один метод, необходимо привлечение разных методов, позволяющих измерить различные параметры функционирования клеток.

Целью данного исследования была разработка инструментального количественного метода оценки плотности суспензии культивируемых *in vitro* клеток на примере клеток суспензии картофеля *S. tuberosum*. Нами был выбран спектрофотометрический метод определения плотности суспензии клеток с использованием окрашивающего агента метиленового синего.

Материалы и методы исследования

В работе использовали 4-х дневную суспензию клеток картофеля, условия выращивания которой описаны в работе [5]. Плотность клеток суспензии определяли подсчетом клеток под микроскопом в гемоцитометре Фукса-Розенталя после мацерации суспензии 20% хромовой кислотой в течение 15 мин при 60°C как средняя величина из шести повторностей по формуле: $A = X \cdot 1000 / 3,2$, где A – плотность клеток/мл, X – количество клеток в камере, $3,2 / 100$ – объем камеры, мл.

В соответствии с разработанной нами методикой спектрофотометрическое определение плотности суспензии клеток включало следующие этапы:

1. В суспензии клеток *S. tuberosum* была вызвана тотальная гибель клеток путем инкубирования суспензии в 10% растворе NaCl в течение часа.

2. Из суспензии убитых клеток готовили серию разведений, плотность клеток в которых была оценена микроскопически. Получены суспензии со следующими значениями плотности: 75 000; 37 500; 18 750; 9375; 4688; 2344 кл/см³.

3. Полученные суспензии окрашивали путем добавления 0,1% раствора метиленового синего в соотношении 5:1 (v/v) и инкубирования с красителем в течение 5 мин.

4. Окрашенные клетки отмывали от избытка красителя с помощью вакуумфильтрационной системы через мембранный фильтр три раза четырехкратным объемом дистиллированной воды.

5. Клетки количественно собирали с мембранного фильтра и краситель экстрагировали этиловым спиртом при периодическом перемешивании в течение 15 мин. Клетки отделяли.

6. В полученных окрашенных спиртовых растворах измеряли адсорбцию света при длине волны 660 нм.

Опыты воспроизведены дважды, в трехкратной повторности каждый. Средние арифметические

значения были нанесены на график и через них методом линейного сглаживания была проведена калибровочная кривая (мастер диаграмм Microsoft Excel, мастер построения линии тренда).

Результаты и обсуждение исследований

Микроскопический подсчет количества клеток в суспензии является длительной и трудоемкой процедурой, которая не позволяет получить достоверных данных при подсчете плотности сильно-агрегированных суспензионных культур. Более быстро и достаточно достоверно можно провести определение плотности суспензии клеточных культур с применением инструментального спектрофотометрического метода. Для этого удобно использовать окрашивание убитых клеток красителем метиленовым синим.

При кратковременном воздействии раствора метиленового синего на растительные клетки, у живых клеток окрашиваются только наружные слои клеточной стенки, а у погибших краситель проникает внутрь клетки, окрашивая цитоплазму и ее компоненты (рис. 1) [6].

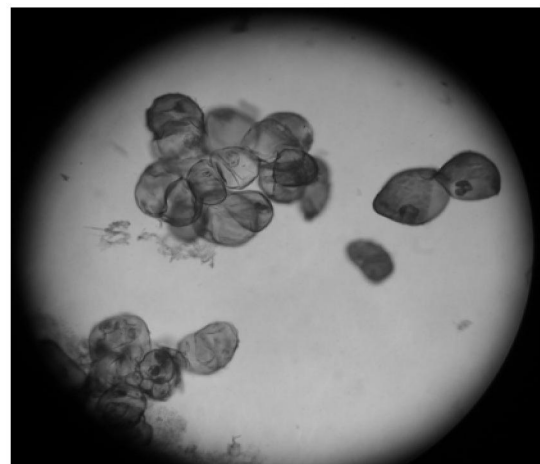


Рис. 1. Клетки *S. tuberosum* после окраски метиленовым синим

Спектр поглощения раствора метиленового синего (рис. 2) имеет 3 максимума поглощения с длинами волн 220, 290 и 660 нм. По нашему мнению, наиболее удобной областью для измерения является длина волны 660 нм, так как это позволяет использовать не только спектрофотометры, но и более простые фотоэлектроколориметры со стеклянными или пластмассовыми кюветами, многоканальные колориметры, измеряющие поглощение в иммунологических планшетах.

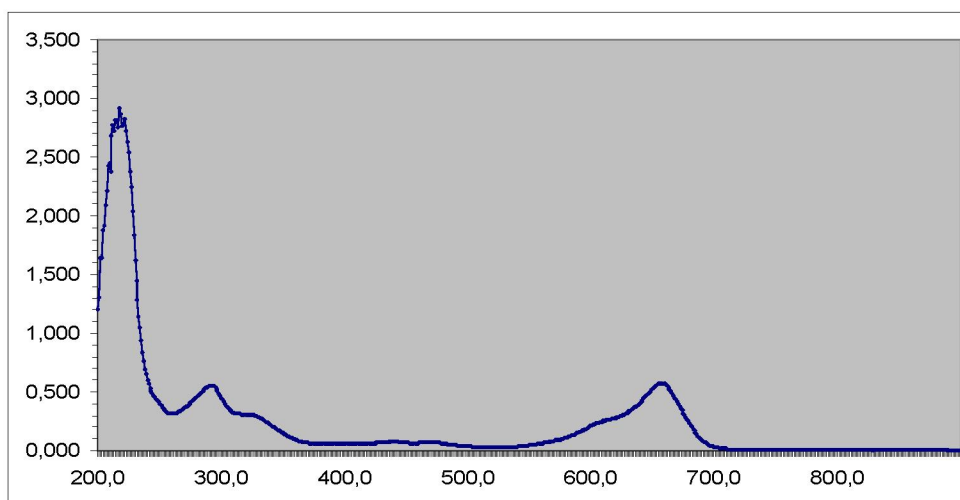


Рис. 2. Спектр метиленового синего в 20% растворе уксусной кислоты в этиловом спирте

После исчерпывающей экстракции метиленового синего этиловым спиртом из суспензий клеток разной плотности измеряли оптическую плот-

ность растворов. По полученным результатам значений адсорбции света построена калибровочная кривая (рис. 3).

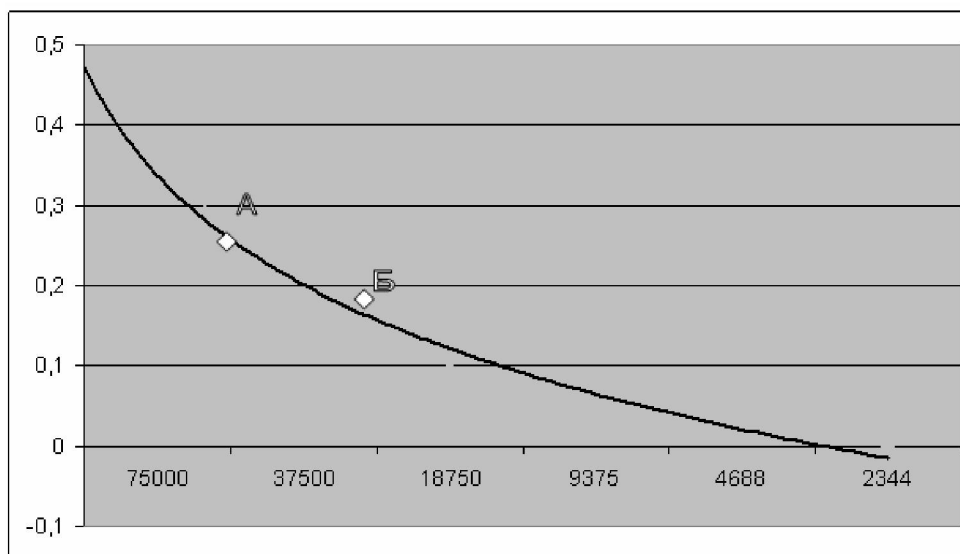


Рис. 3. Калибровочная кривая плотности суспензии клеток *S. tuberosum* по калибровочной кривой при длине волны 660 нм

Образцы двух различных культур клеток были взяты для пробного тестирования. Для проверки метода их плотность предварительно была оценена микроскопически. При этом для первой культуры плотность суспензии микроскопически была определена в 30%, а для второй культуры – в 75%. Далее плотность суспензий указанных культур была оценена спектрофотометрически по вышеописанной методике и результаты измерения

поглощения света были отложены на калибровочной кривой (первая культура – точка А; вторая – точка Б). Результаты спектрофотометрического определения их плотности оказались в хорошем соответствии с микроскопическим определением.

По результатам наших исследований, было показано, что спектрофотометрический метод определения плотности суспензии культуры клеток существенно быстрее микроскопического.

Разработанный спектрофотометрический метод определения плотности клеток представляет собой удобный вариант для скрининговых исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-Пресс, 1999. 159 с.
2. Носов А.М. Культура клеток высших растений – уникальная система, модель, инструмент // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 6. С. 834-844.
3. Максимова Н.И., Мерзляк М.Н., Гусев М.В. Культура клеток и тканей в изучении взаимодействий патогена и растения-хозяина // Биол. науки. 1990. № 2. С. 6-19.
4. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Кунаева Р.М. Использование культивируемых *in vitro* клеток картофеля для оценки биологической активности изолятов *Fusarium solani* // Биотехнология. Теория и практика. 2005. №3. С. 128-135.
5. Сапко О.А., Утарбаева А.Ш., Кунаева Р.М., Лигай Г.Л.

Получение культивируемых *in vitro* клеток *Solanum tuberosum* и использование их в фитовирусологических исследованиях // Изв. НАН РК. Серия биологическая и медицинская. 2004. № 2. С. 76-83.

6. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие. Уфа, 2002. 78 с.

Резюме

Суспензиядағы картоп (*Solanum tuberosum*) клеткаларының тыңыздыңын метилен көк бояуын пайдаланып спектрофотометриялық әдіспен анықтау сипатталған.

Summary

In this article was described the spectrophotometrical method of density definition of potato *Solanum tuberosum* suspension cells with use of dye methylene dark blue.

УДК 576.88; 581.192.7

Институт молекулярной биологии
и биохимии им. М. А. Айтхожина,
г. Алматы

Поступила 20.12.08г.