

УДК 576.88; 581.192.7

О.А.САПКО, А.Н.МИХАЛЕВ, А.Ш.УТАРБАЕВА, Д.Б.ЖАБАЕВА, Р.М.КУНАЕВА

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК СУСПЕНЗИИ SOLANUM TUBEROSUM

(Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина
КН МОН РК)

В статье описывается способ количественного спектрофотометрического определения жизнеспособности супензионных клеток картофеля *S. tuberosum* с использованием красителя метиленового синего.

В настоящее 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 технологий в медицине, сельском хозяйстве и промышленности. Важной характеристикой для выяснения эффективности функционирования клеточных культур является оценка их жизнеспособности, которая определяется как соотношение живых и мертвых клеток.

Жизнеспособность клеток оценивают под микроскопом по движению протоплазмы, наличию неповрежденного ядра, проницаемости клеточной стенки, с помощью приживленных красителей и дальнейшего подсчета окрашенных и неокрашенных клеток. Это могут быть вещества, которые включаются интактными живыми клетками (например, синий Эванса), или вещества, участвующие в метаболизме и способные к флюоресценции (флуоресцеиндиацетат – показатель активности эстеразы), или к окрашиванию (соли тетразолия – показатель эффективности дыхания) [1, 2, 3].

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

Наиболее часто используемыми методами оценки жизнеспособности клеток являются методы, основанные на микроскопировании материала. Однако, эти методы довольно трудоемки и малодостоверны для оценки окрашенности каждой отдельной клетки при характеристике высокоагрегированных клеточных культур.

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали 4-х дневную супензию клеток картофеля, условия выращивания которой описаны в работе [4]. Цикл выращивания составил 7-8 дней при исходной плотности $0,5-0,7 \times 10^5$ кл/мл. Плотность клеток супензии определяли подсчетом в гомоцитометре Фукса-Розенталя после макерации супензии 20% хромовой кислотой в течение 15 минут при температуре 60°C.

Жизнеспособность клеток под микроскопом оценивали по приживленной окраске 0,1% раствором метиленового синего (1:1) [5]. При каждом подсчете просматривали около 1000 клеток.

В соответствии с разработанной нами методикой спектрофотометрическое определение жизнеспособности клеток супензии включало следующие этапы:

1. Супензию клеток *S. tuberosum* с жизнеспособностью 70-75% разделяли на 2 равные части с одинаковой плотностью клеток ($1,2 \times 10^5$ кл/мл).

2. В первой части была вызвана тотальная гибель клеток путем инкубирования супензии в 10% растворе NaCl в течение 1 часа.

3. Супензию мертвых клеток смешивали с клетками исходной супензии в следующих соотношениях (% об.): 100:0; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80 и 0:100.

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

5. Окрашенные клетки отмывали от избытка красителя с помощью вакуум фильтрационной системы через мембранный фильтр три раза четырехкратным объемом дистиллированной воды.

6. Клетки количественно собирали с мембранныго фильтра и краситель экстрагировали 20% раствором уксусной кислоты в этиловом спирте при периодическом перемешивании в течение 15 минут. Клетки отделяли.

7. В полученных окрашенных растворах изменили 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 прямая (мастер диаграмм Microsoft Excel, мастер построения линии тренда).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Микроскопический подсчет живых и мертвых клеток в суспензии является длительной и трудоемкой процедурой. Кроме того, суспензия клеток *S. tuberosum* часто содержит большое количество агрегатов (рис.1), поэтому оценка жизнеспособности с применением микроскопического метода затруднена.

Более достоверно провести оценку жизнеспособности агрегированных клеточных культур можно с применением инструментального спект-

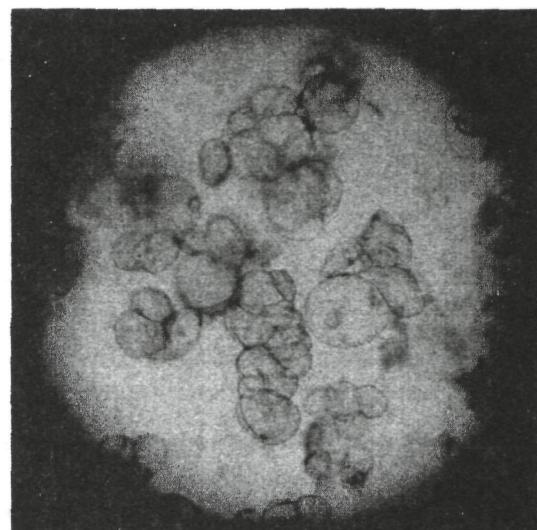


Рис. 1. Суспензия клеток *S. tuberosum*

рофотометрического метода. Для этого удобно использовать прижизненное окрашивание клеток метиленовым синим. Использование красителя основано на том, что метиленовый синий клетки не повреждает и через оболочку живых клеток в цитоплазму не проникает [6].

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.2). Эффект разницы в поглощении метиленового синего живыми и мертвыми клетками и был использован для разработки спектрофотометрического метода определения жизнеспособности клеток.

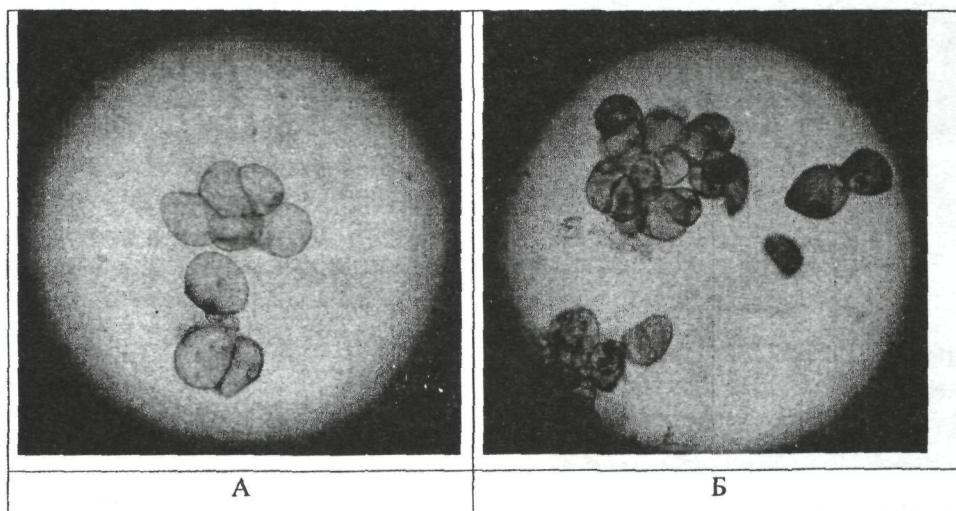


Рис. 2. Клеточные агрегаты живых (А) и мертвых (Б) клеток *S. tuberosum* после окрашивания метиленовым синим

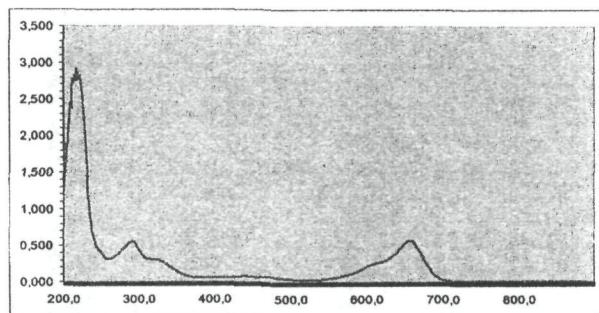


Рис. 3. Спектр метиленового синего в 20% растворе уксусной кислоты в этиловом спирте

Спектр поглощения раствора метиленового синего (рис.3) 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 фото-электро колориметры со стеклянными или пластмассовыми кюветами.

После окрашивания погибших клеток метиленовым синим, краситель не экстрагируется полностью из них водой, спиртом или органическими растворителями. Поэтому для исчерпывающей экстракции красителя нами была выбрана смесь уксусной кислоты и этилового спирта в соотношении 1:4 (рис. 4).

После исчерпывающей экстракции метиленового синего раствором 20 % уксусной кислоты в этиловом спирте из смесей живых и мертвых клеток разного состава, измеряли оптическую плотность растворов. По полученным ре-

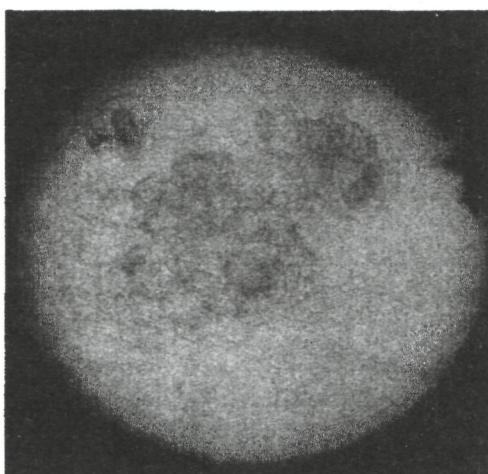


Рис. 4. Клетки суспензии *S. tuberosum* после экстракции красителя 20 % раствором уксусной кислоты в этиловом спирте

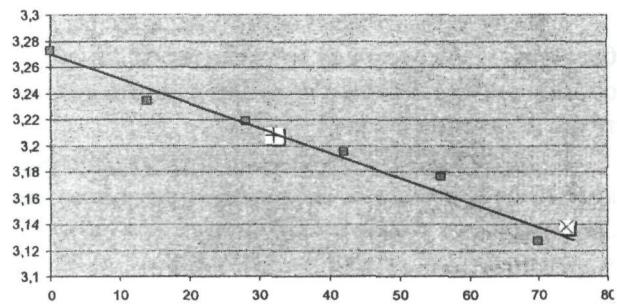


Рис. 5. Калибровочная прямая смеси живых и мертвых клеток суспензии *S. tuberosum*

зультатам значений адсорбции света была построена калибровочная прямая (рис.5).

Образцы двух различных культур клеток были взяты для пробного тестирования. Для проверки метода их жизнеспособность предварительно была оценена микроскопически. При этом для первой культуры жизнеспособность микроскопически была определена в 30%, а для второй культуры – в 75%. Далее жизнеспособность указанных культур была оценена спектрофотометрически по вышеописанной методике и результаты измерения поглощения света были отложены на калибровочной прямой (точки А и Б). Результаты спектрофотометрического определения их жизнеспособности оказались в хорошем соответствии с микроскопическим определением.

По результатам наших исследований было показано, что спектрофотометрический метод определения жизнеспособности культуры клеток существенно быстрее микроскопического и более достоверен при анализе агрегированных культур. Разработанный спектрофотометрический метод определения жизнеспособности представляет собой удобный вариант для скрининговых исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Widholm J.M. The Use of Fluorescein Diacetate and Phenosafranine for Determination of Viability of Cultured Plant Cells // Stain Technol. 1972. V. 47. № 4. P. 189.
2. Bornman C.H., Bornman J.F. Plant Protoplast Viability // The Physiological Properties of Plant Protoplast. Ed. Pilet P.E. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 1985. P.29.
3. Биотехнология растений: культура клеток. М.: Агропромиздат, 1989. 280 с.
4. Сапко О.А., Умарбаева А.Ш., Кунаева Р.М., Лигай Г.Л. Получение культивируемых *in vitro* клеток *Solanum tuberosum* и использование их в фитовирусологических исследованиях // Известия НАН РК, серия биологическая и медицинская. 2004. № 2. С. 76-83.

5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 233 с.

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

Резюме

Мақалада *Solanum tuberosum* картобы сусpenзиялық клеткаларының тіршілік қабілеттілігін метиленді көк боя-

ғышты қолдана отырып, спектрфотометриялық анықтау әдісі жазылған.

Summary

The spectrophotometric method of quantitative determination of viability of potato *Solanum tuberosum* suspension cells with use metylene blue dye was described.