

АНАЛИЗ ИОННЫХ ТОКОВ ЧЕРЕЗ ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ПРИ ПОМОЩИ ТЕХНИКИ ПЭТЧ-КЛАМП

Ю. В. Толкачева

Белорусский государственный университет, г. Минск;
berenikahoma8@gmail.com; науч. рук. – П. В. Гриусевич

Изучение процессов транспорта ионов – одно из важнейших направлений клеточной биологии. Одним из актуальных электрофизиологических подходов является техника пэтч-кламп, которая заключается в изолировании фрагмента плазматической мембраны специальными микроэлектродами, регистрации и анализе трансмембранных токов. Данная техника может использоваться научными центрами для изучения транспорта ионов у растительных и животных клеток. Основным отличием работы с растительными клетками является энзиматическое выделение протопластов для того, чтобы разрушить клеточную стенку. Работы можно проводить на различных объектах, таких как линии животных клеток НЕК293, модельном растении *Arabidopsis thaliana* L. и сельскохозяйственных культурах, таких как *Triticum aestivum* L., *Helianthus annuus* L.

Ключевые слова: пэтч-кламп; электрофизиология; *Arabidopsis thaliana* L.; протопласты; ионные каналы.

Транспорт ионов через плазматическую мембрану осуществляется посредством функционирования специализированных белковых систем, способных к переносу веществ через липидную фазу. В случае, если вещество диффундирует по градиенту электрохимического потенциала без энергетических затрат, такой вид транспорта называют пассивным. Пассивные потоки могут осуществляться за счет специализированных ион-транспортных систем белковой природы, которые называются ионными каналами.

В настоящее время для эффективного анализа проводимости плазматической мембраны актуальным представляется использование электрофизиологической техники пэтч-кламп. Термин «patch-clamp» дословно переводится как «изолированный фрагмент», на котором и происходит исследование ионной проводимости. За создание данного метода немецкие ученые Эрвин Неер и Берт Сакман в 1991 году [1, с. 2] были удостоены Нобелевской премии по физиологии и медицине. Неер и Сакман усовершенствовали уже имеющуюся на тот момент методику локальной фиксации потенциала с помощью использования микроэлектродов с более широким кончиком (1–2 мкм), что позволило электроду не проникать в клетку, а фиксировать участок клеточной мембраны и создавать гигаомный контакт.

Техника пэтч-кламп получила широкое применение для регистрации и анализа ионных токов на плазматической мембране как на животных клетках, так и на растительных. Выбор объекта исследования зависит исключительно от задач, которые определяют для себя научные центры в рамках научного исследования.

Одним из широко распространённых объектов является линия животных клеток НЕК 293. Это клетки надпочечников абортированного эмбриона человека, они отличаются простотой культивирования, а также удобством в работе с методикой пэтч-кламп. Для их культивирования используется среда Дульбекка (Dulbecco's modified eagle's Medium). Способ поддержания культуры состоит в трипсинизации клеток для отделения монослоя от стенок матраса и пересадке их на новую питательную среду. Для этого старая среда из матраса удаляется и клетки омываются фосфатным буфером для удаления излишков кальция. После этого добавляется 0.5–1 мл трипсина, чтобы адгезивные клетки перешли в раствор, и 5 мл свежей среды. Далее клетки необходимо центрифугировать 5–7 минут при 1200 об/мин, после чего пересадить на новые матрасы со свежей питательной средой [2, с. 19]. Пересадку клеток необходимо проводить 2–3 раза в неделю, тем самым поддерживая концентрацию приблизительно 1×10^5 клеток/мл. нельзя допускать концентрации 1×10^6 клеток/мл и выше. Данная линия способна к быстрому образованию гигантского контакта для абсолютного большинства клеток.

Кроме этого, многие научные центры для изучения транспортных систем останавливают свой выбор на растительных объектах. В первую очередь используют основной модельный объект *Arabidopsis thaliana* L. Арабидопсис удобен для работы, так как имеет ряд преимуществ: короткий жизненный цикл, быстрое получение достаточного количества семян небольших размеров. На сегодняшний день для данного объекта хорошо охарактеризованы физиологические процессы, понятны генетические механизмы экспрессии генов.

В последние годы актуальным представляется изучение транспорта у сельскохозяйственных растений в связи с необходимостью реализации подходов для повышения их урожая. Среди таких растений особый интерес представляют пшеница мягкая (*Triticum aestivum* L.) и подсолнечник однолетний (*Helianthus annuus* L.). Пшеница – важнейшая сельскохозяйственная культура Европы, а также занимает второе место по возделыванию в мире. Подсолнечник является важной масличной культурой, чье масло используется в пищевой промышленности, производстве биотоплива. При этом масло подсолнечника практически невозможно заменить аналогами.

Для культивирования растений в лаборатории используют подходы стерильных культур и гидропонику. При культивировании стерильной культуры используют стандартную среду Мурашиге и Скуга, посадку семян осуществляют в виде плотной культуры. Семена высаживают на поверхность твердой среды в линию в верхней части чашки Петри. Ранее было показано, что если в ходе всего периода культивирования удерживать чашки в вертикальном положении, то корень проростка развивается на поверхности среды. Преимущество данного метода состоит в том, что выращенный таким образом проросток можно легко отделить от среды пинцетом. Повреждения корня при этом минимальны.

Основным отличием работы в технике пэтч-кламп с растительными клетками от животных клеток является необходимость отделения клеточной стенки от протопластов для того, чтобы получить высокоочищенную плазматическую мембрану. Одним из способов получения протопластов является обработка растительного материала раствором, который содержит специально подобранные ферментативные смеси. Для выделения протопластов используются молодые листья или корни (7–12 дней). Растительный материал измельчается специальной бритвой до размеров от 0,5 до 1,5 мм в пластиковой чашке Петри. Предварительно в чашку добавляется ферментативный раствор, содержащий целлюлазу, целлюлолизин, пектолиазу и другие вещества (см. таблица). Далее после измельчения фрагменты растений, погруженные в ферментативный раствор, помещаются в термостат на 35–50 мин при температуре 27–28 °С, и изолируются от света, так как целлюлолитические ферменты являются светочувствительными. Обеспечивается медленное перемешивание за счет горизонтального вращения столика качалки (30–60 оборотов в минуту). После инкубации суспензию протопластов отфильтровывают через специальное нейлоновое сито с диаметром пор 30–50 мкм. Непереваренные остатки корней отжимаются нажатием стеклянного шпателя и промываются специальным раствором для хранения протопластов. Выделенные протопласты содержатся в этом растворе на льду, где сохраняют жизнеспособность в течение 10–12 часов [3, с. 51].

Для создания гигаомного контакта с плазматической мембраной клетки используются специальные микроэлектроды, или пэтч-пипетки. Электроды изготавливаются в микроэлектродном пуллере, причем настройки пуллера позволяют создавать электроды с диаметром кончика от 0,5 до 1 мкм. Электроды необходимо хранить таким образом, чтобы сохранить их целостность. Для регистрации трансмембранных токов необходимо создание гигаомного контакта (сопротивление выше 1 ГОм) между плазматической мембраной и кончиком пэтч-пипетки. Такое высокое сопротивление необходимо для получения записей с низким уров-

нем шума, что позволяет записывать токи даже с одиночных ионных каналов. Процесс установления гигаомного контакта не имеет значительных отличий для растительных и животных клеток.

Таблица

Состав смеси для выделения протопластов из корней арабидопсиса

Ферменты	1.5 % целлюлаза Onozuka RS (Yakult Honsha, Япония), 0.1 % пектолиаза Y-23 (Yakult Honsha, Япония), 1 % целлюлолизин (CalBiochem, Великобритания)
Ионный состав	10 мМ CaCl ₂ , 2 мМ KCl, 1 мМ MgCl ₂
рН	5.8–6.0
Осмолярность	300 мОсм/кг

Методика пэтч-кламп имеет несколько конфигураций, одной из наиболее часто используемых является конфигурация whole-cell, или «целая клетка». Она заключается в том, что при подведении микроэлектрода к протопласту подается кратковременное отрицательное давление, в результате чего фрагмент мембраны, изолированный кончиком пэтч-пипетки, разрушается, и содержимое цитоплазмы смешивается с пипеточным раствором. Таким образом, можно точно контролировать состав как омывающего, так и внутриклеточного растворов. Преимущество данной конфигурации состоит в том, что клеточные структуры сохраняют свою целостность, а также проводится регистрация тока со всех ионных каналов клетки [4, с. 54].

Библиографические ссылки

1. Verkhatsky A., Parpura V. History of Electrophysiology and the Patch Clamp // Methods in molecular biology. 2014. P. 1 – 3. DOI: 10.1007/978-1-4939-1096-0_1.
2. Scalable Production of AAV Vectors in Orbitally Shaken HEK293 Cells / D. Blessing [et al.] // National Center for Biotechnology Information. 2019. Vol. 13. P. 14–26. DOI: 10.1016/j.omtm.2018.11.004.
3. Demidchik V. V., Tester M. A. Sodium fluxes through nonselective cation channels in the plant plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis* roots // Plant Physiology. Vol. 128. P. 379–387. DOI: 10.1104/pp.010524.
4. Современные тенденции в развитии метода локальной фиксации потенциала: новые возможности для нейрофармакологии и нейробиологии / А. Н. Шуваев [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2015. № 4. С. 54–55.