

ПРАКТИЧЕСКИЕ МОДУЛИ

МЫ С ВАМИ НАХОДИМСЯ В КУЛЬТУРАЛЬНОМ БОКСЕ

(соответствующие иллюстрации находятся в папке Иллюстрации и презентации;
??? – условное обозначение «Вопроса от аудитории»)

1.jpg

(подпись: Помещение культурального блока:

предбоксник (серый цвет) и бокс (зеленый)

1-СО₂-инкубатор

2-холодильник

3-ламинар

4-стол с микроскопами: световым (6) и инвертированным световым (7)

5-шкаф с посудой)

Познакомимся поближе со всем, что вы здесь можете увидеть.

Посмотрите направо, перед вами находится СО₂ инкубатор (термостат).

Foto1.jpg

(Подпись: СО₂-инкубатор 1-двойная дверь,

2-панель управления подачей СО₂

3-многофункциональное цифровое табло

4-ручка переключения регулируемых параметров

5-панель управления регулируемыми параметрами (температура);
стрелкой показаны баллоны с СО₂)

??? - А зачем в боксе нужен СО₂ инкубатор?

- При выращивании клеток в посуде типа чашек Петри и пластиковых планшетов клеткам необходим СО₂ (5%). При культивировании клеток в сосудах Карреля, заткнутых пробками, СО₂ не нужен, и его отключают.

??? - А почему этот прибор называется еще и термостатом?

- Прибор способен поддерживать определенную температуру, которую можно задавать исходя из условий эксперимента. Так, например, для роста и развития клеточной культуры обязательным условием является температура 37°C.

Рядом с СО₂-инкубатором расположен холодильник с реагентами, растворами и т.п.
Слева находится шкаф, где хранится вся стерильная посуда.

Центральное место в боксе занимает ламинар. Ламинар – это место, где производятся все манипуляции с клетками, т. е. это собственно рабочее место экспериментатора.

Laminar.jpg

(подпись

1. Включение/ выключение потока воздуха.
2. Включение/ выключение света или ультрафиолета.
3. Регулировка скорости потока стерильного воздуха с задней стенки ламинара.
4. Лампа дневного света и ультрафиолетовая лампа.
5. Задняя стенка с фильтром, через которую осуществляется подача стерильного воздуха (поток стерильного воздуха идет с лица работающему).

6. Стол ламинара с металлической поверхностью)

Давайте посмотрим, как организовано Ваше рабочее место в ламинаре.

Справа в углу находится стакан с пинцетами, автоматическими пипетками, скальпелями. С правой стороны находятся пенал со стеклянными пипетками, резиновая груша и стакан со спиртом. Слева расположена стерильная упакованная в фольгу посуда и приспособления для работы с клетками (наконечники, пробки, фильтры). Ближе к центру стола находится горелка со спиртом, закрытая керамическим колпачком.

Перед работой поверхность стола тщательно промывают водой с моющим раствором и обрабатывают кусочком ваты, смоченной в спирте.

??? – А для чего нужна такая длительная и тщательная подготовка?

Такая подготовка к работе необходима потому, что даже осевшая на поверхность стола пыль является потенциальным источником заражения культуры. При работе все операции следует проводить в непосредственной близости от зажженной горелки, чтобы обеспечить максимальную защиту растворов от заражения. Кисти рук должны находиться между горелкой и задней стенкой ламинара.

Ready.jpg

Справа от Вас расположен стол с микроскопами. Один из них – инвертированный (источник света находится сверху). Он позволяет рассматривать объект снизу, что очень удобно, так как клетки прикрепляются ко дну культуральной посуды.

Invert.jpg

Другой световой микроскоп несет на себе фотонасадку (показана стрелкой) для фотографирования клеток при различных условиях освещения.

Fotoplus.jpg

Теперь поговорим о технике безопасности.

В первую очередь - рабочая одежда.

Человек, приступающий к работе, должен быть в чистом халате, шапочке и ватно-марлевой повязке.

Sit.jpg

Перед работой в ламинаре необходимо обработать руки ватой, смоченной в спирте, после этой обработки уже не следует выносить руки за пределы ламинара. Если это случилось, то необходима повторная обработка рук для исключения попадания микроорганизмов в стерильную зону.

??? - Скажите, почему бы не использовать перчатки? Ведь если нужна стерильность при работе, то лучше надеть резиновые медицинские перчатки?

Хотя наша работа и требует максимальной стерильности, использование резиновых перчаток может быть опасно для человека. При стерильной работе используются горючие жидкости. При обработке посуды горячей ватой, стерилизации стола спиртом может произойти возгорание резиновых перчаток.

??? – Ясно. А если возгорание в ламинаре все же произошло? Что в этом случае предпринять?

Главное при пожаре не паниковать. Действовать быстро, но не суетливо, сохраняя спокойствие. Всегда нужно помнить, что в лаборатории имеется асбестовое одеяло, которым надо как можно скорее накрыть место возгорания, предотвращая доступ

кислорода к источнику пламени. Однако проще быть внимательным и не допустить возгорания, чем потом тушить возникший пожар.

Save.jpg

ТЕПЕРЬ МЫ БОЛЕЕ ПОДРОБНО ПОГОВОРИМ О ПОСУДЕ, КОТОРАЯ ПРИМЕНЯЕТСЯ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК.

Flacks.jpg

(подпись:

1. Пластиковые планшеты
2. Чашки Петри
3. Стеклянные флаконы
4. Плоскодонные бутылки
5. Сосуды Карреля)

Из первого занятия Вы знаете, что в боксе находится шкаф, в котором хранится стерильная посуда. Откроем его.

Shkaff.jpg

(подпись:

1. Резиновые пробки.
2. Одноразовые наконечники.
3. Фильтры
4. Флаконы для питательных сред разного объема.
5. Пеналы с пипетками.
6. Сосуды для выращивания клеток (сосуды Карреля, чашки Петри).
7. Одноразовые пластиковые планшеты и чашки Петри.
8. Спирт.
9. Вата.)

Все, что расположено на этой первой полке (резиновые пробки, фильтры, одноразовые наконечники) стерилизуется автоклавированием (1 атм., 40 мин).

В пластиковые наконечники (их можно использовать повторно) для автоматических пипеток вставляются ватные тампоны.

Посуда, расположенная на второй полке, за исключением пластиковой посуды, стерилизуется в сухожаровом шкафу (180°C, 2 ч.).

??? - А нужна ли подготовка посуды перед обработкой паром или температурой?

Конечно, перед стерилизацией все отверстия в стеклянной посуде (горлышки бутылей, флаконов, сосудов Карреля) заворачиваются в двойной слой фольги. При этом внешний слой фольги должен быть длиннее внутреннего. Это обеспечивает дополнительную защиту внутренней среды сосуда или флакона. Перед наворачиванием фольги на длинные горлышки сосудов Карреля, под поверхность фольги внутрь горлышка помещается небольшой комочек ваты так, чтобы при переворачивании сосуда отверстием вниз, вата не выпадала.

Karrel.jpg

Резиновые пробки, наконечники для автоматических пипеток, фильтродержатели с фильтрами помещаются в стеклянные стаканы, которые также закрываются двойным слоем фольги.

Важным этапом подготовки к работе является мытье посуды. Использованная стеклянная посуда замачивается в моющем растворе в теплой воде на несколько часов. Посуда тщательно отмывается ершиком. Затем трижды споласкивается в большом объеме дистиллированной воды. После этого посуда высушивается и стерилизуется. Также поступают пеналами, где находятся пипетки.

Перед стерилизацией полость пипетки многократно промывается горячей водой с моющим средством. Пипетки кипятятся в этом растворе, затем трижды промываются большим объемом дистиллированной воды и сушатся. Далее (см. рисунок) в верхний конец пипетки плотно вставляется ватный тампон. Часть тампона, не вошедшая в полость пипетки, сжигается и, оставшаяся после этого «зола» удаляется. Затем на дно пенала помещается кусок ваты и укладываются пипетки (вниз острием). На вложенные пипетки накладывается еще один кусок ваты, пенал закрывается слоем фольги и стеклянным колпачком. Пипетки готовы к стерилизации.

Penal.jpg

Резиновые пробки, фильтродержатели (после извлечения фильтров) и пластиковые наконечники кипятятся 15 мин в моющем растворе и трижды споласкиваются в больших объемах дистиллированной воды, высушиваются и автоклавируются.

Одноразовая посуда, если условия ее хранения соблюдены, не нуждается в дополнительной стерилизации. Ее повторное использование не допустимо.

...еще о стеклянных пипетках...

Пожалуй, основную сложность для начинающих «клеточников» представляет «наука» обращения с пипеткой.

Рассмотрим два основных момента: 1) извлечение пипетки из пенала

и

2) правильный захват пипетки для обеспечения безопасной и продуктивной работы.

1) Напомним, что в Вашем ламинаре на столе пенал с пипетками находится с правой стороны. Сначала необходимо снять крышку с пенала над пламенем горелки и отставить ее вправо.

HowPipt2.jpg

Держа пенал в левой руке, и толкая его от себя, добиться выдвижения кончиков пипеток. Большим пальцем правой руки зафиксировать пипетку нужного объема

HowPipt3.jpg

Перехватить пипетку пальцами левой руки, в которой находится пенал, как можно ближе к тупому концу.

HowPipt4.jpg

Удерживая пенал и пипетку в левой руке (острый кончик должен быть направлен вглубь (и вверх) ламинара), взять крышку пенала со стола правой рукой и закрыть пенал над пламенем горелки. При этом надо следить, чтобы пипетка не касалась каких-либо поверхностей в ламинаре. Перехватить закрытый пенал в правую руку и отложить вправо.

Примечание: если Вы извлекли из пенала последнюю пипетку, 1 пенал можно не закрывать крышкой.

HowPipt1.jpg

К тупому концу (с ватой) пипетки через резиновый шланг присоединяется груша.

2) Пипетка готова к использованию.

Пипетку в руке следует захватить как можно ближе к ее тупому концу. Не держите пипетку за шланг, соединяющий ее с грушей.

Пипетка должна удобно лежать в руке, не стесняя движений и не вызывая напряжения ладони и пальцев. Вы должны убедиться, что пипетка Вас

«слушается», и Вы полностью контролируете ее движения в любом, нужном Вам, направлении.

HowPipt6.jpg

К РАСТВОРАМ, ИСПОЛЬЗУЮЩИМСЯ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК ОТНОСЯТСЯ: питательные среды, сыворотка, красители, антибиотики, трипсин и т.д.

Питательные среды содержат L-изомеры аминокислот, неорганические соли, витамины и другие компоненты (сахара, кислоты, дрожжевой экстракт и т.д.). Перед использованием питательных сред в них добавляется определенное количество (чаще всего 5-10%) *сыворотки* (эмбриональной, крупного рогатого скота и т.д.). Нередко в состав питательных сред вводят различные *ростовые факторы* (эпидермальные ростовые факторы - EGF, факторы роста фибробластов - FGF, эритропоэтин, интерлейкин-3 – IL-3). Ростовые факторы – это высокоспецифичные белки сыворотки; большинство из них вносится в питательные среды в очень незначительных количествах: $10^{-9} - 10^{-11}$ М. Функцией ростовых факторов является прежде всего стимуляция пролиферации клеток и клеточного метаболизма.

Примерами богатых многокомпонентных сред могут служить: среда 199, среда DMEM. Эти среды мы и будем использовать.

В качестве примера *культуры клеток* нами будет использоваться культура СПЭВ. Линия получена в 1959 г. К.С. Куликовой в Московском НИИ вирусных препаратов. Культура представлена эпителиоподобными клетками почки эмбриона свиньи. Сплошной монослой образуется через 3-4 дня после посева и не деградирует в течение 4-х суток. Пассирование проводят на 2-е сутки после образования монослоя. Концентрация клеток при пересеве должна составлять не менее 450 тыс. кл./мл.

Для данной клеточной культуры существует ряд оптимальных композиций питательных сред. Приведем пропись одной из них:

Компонент питательной среды	Содержание, %
Среда DMEM	40
Гидролизат лакт-альбумина (ГЛА)	40
Среда 199	10
Глутамин	1-2
Сыворотка эмбриональная	8-9
Нистатин	0,05
Антибиотики (на 100 мл):	
Пенициллин 1000000 ед.	20 мкг
Гентамицин 1000 ед.	25 мкл

Питательные среды готовятся переливанием в один флакон всех составных частей в направлении уменьшения объема (DMEM→ ГЛА→ среда 199→ и т. д.).

Media.jpg

Некоторые компоненты составных питательных сред не могут быть стерилизованы в автоклаве или сухожаровом шкафу. Их необходимо подвергнуть стерилизации фильтрованием:

Подготовка фильтра к работе. Приспособление для фильтрации состоит из пластикового или металлического фильтродержателя (см. рисунок) и собственно фильтра.

filtr3.jpg

Фильтр вставляют в фильтродержатель,

filtr1.jpg

собирают все части фильтродержателя, помещают собранное приспособление в стеклянный стакан, закрывают двумя слоями фольги и автоклавируют.

filtr.jpg

Ваш фильтр готов к работе.

Горлышки всех стерильных флаконов и бутылей закрыты двумя слоями фольги. Перед тем как начать фильтрование в приготовленный флакон, надо осторожно снять верхний слой фольги, нижний слой обработать горячей ватой, смоченной в спирте.

filtr2.jpg

Затем стерильный фильтродержатель с фильтром извлекается из стеклянного стакана. Носиком нижней части фильтродержателя протыкается обожженный слой фольги. В отверстие крышки фильтродержателя вставляется шприц с раствором, который надо стерилизовать. При плавном нажатии на поршень шприца (1), вся жидкость скапливается в полости фильтродержателя (2) и попадает затем в стерильный флакон (3).

filtr4.jpg

Фильтродержатель снимается с фольги, которая еще раз обжигается горячей ватой. Флакон со стерильным раствором закрывается пробкой над горелкой.

OpenFlk.jpg

При дальнейшем использовании стерильных растворов, перед открыванием посуды, резиновую пробку следует обработать горячей ватой, смоченной в спирте, по границе контакта пробки и стекла.

Pass3.jpg

Это правило должно неукоснительно соблюдаться при работе с любой стерильной посудой.

Красители

Обратите внимание на то, что среда имеет красный цвет. Это достигается добавлением в среду красителя Phenol Red.

??? – А с какой целью?

Красители в питательные среды добавляются для того, чтобы контролировать кислотность среды в любой момент времени. Клетки в процессе роста подкисляют среду, и краситель приобретает желто-оранжевое окрашивание.

Посмотрите, как свежая, вновь налитая питательная среда (2) отличается по цвету от среды, в которой культивировались клетки (1).

New-Old.jpg

Обратите внимание на прозрачность среды. Замутнение среды или изменение цвета красителя на ярко-желтый или красно-синий (малиновый) может свидетельствовать о заражении среды и культуры клеток микроорганизмами.

Антибиотики

Мы используем такие антибиотики как пенициллин, гентамицин (антибактериальные препараты) и противогрибковый препарат нистатин. Раствор нистатина готовится в кипящем спирте (1:1).

Трипсин, версен

Трипсин и версен применяются для дезагрегации монослоя при пересеве клеточной культуры или для выделения клеток из тканей при получении первичных культур. При пересеве обычно используют раствор трипсин – версена в соотношении 1:1. Этот готовый раствор поставляется фирмой-производителем.

Через 3 – 4 суток после первого посева, вырастает плотный монослой клеток. Процесс образования монослоя можно наблюдать в инвертированный микроскоп.

Growing.jpg (подпись: Рост миобластов в культуре)

ТАКАЯ КУЛЬТУРА НУЖДАЕТСЯ В ПЕРЕСЕВЕ. Этот процесс можно разделить на следующие этапы: трипсинизация и рассев клеток. Рассмотрим эти этапы более подробно.

Перед началом работы необходимо проверить правильность расположения посуды и инструментов на столе ламинара (см. занятие1). Обработать резиновые пробки всех сосудов с растворами горячей ваты, смоченной в спирте.

Процесс *трипсинизации* включает следующие стадии (показаны стрелками):

1. Открывание емкости с трипсином и помещение туда стеклянной пипетки.
2. Слив среды из сосуда Карреля с клетками в пустой чистый стакан (емкость для слива).
3. Добавление трипсина в сосуд с клетками (раствор трипсина должен покрывать поверхность субстрата с клетками).
4. Удаление трипсина из сосуда с клетками в емкость для слива.
5. Повторное добавление такого же объема трипсина в сосуд Карреля.

Trip-cia.jpg

(подпись:

А- горелка (спиртовка)

Б- емкость для слива

В- бутыл с трипсин-версеном

Г- чистая посуда (сосуд Карреля)

Д- сосуд Карреля с клеточным монослоем

Е- керамический стакан с инструментами: пинцеты, скальпель и т.д.

Ж- керамический колпачок на спиртовку

З- емкость со спиртом

И- вата

К- пенал со стеклянными пипетками

Л- резиновая груша со шлангом)

Сосуд Карреля помещается в термостат на 10 – 15 мин. при температуре 37°C для трипсинизации. Сосуды Карреля необходимо время от времени слегка встряхивать для обеспечения равномерности протекания процесса. О ходе трипсинизации можно судить по степени прозрачности раствора трипсин - версена. Открепляясь от поверхности посуды, клетки выходят в раствор. При этом наблюдается его замутнение (1).

Tripsin.jpg

Перед началом второго этапа – *рассева суспензии клеток* – сосуды Карреля маркируются: на сосуде, в котором был монослой, ставится знак «+», а на сосуде, где не было монослоя (или на новых сосудах) ставится знак «-».

Необходимо убедиться в том, что на рабочем столе нет ничего лишнего, проверить правильность расположения посуды и инструментов на столе ламинара. Еще раз обработать резиновые пробки всех сосудов с растворами горячей ваты, смоченной в спирте.

Media-In.jpg (подпись:

А- горелка (спиртовка)

Б- бутыл с питательной средой

В- сосуд Карреля с суспензией клеток в трипсине («+»)

Г- новый сосуд Карреля («-»)

Д- емкость со спиртом

Е- керамический стакан с инструментами: пинцеты, скальпель и т.д.

Ж- керамический колпачок на спиртовку

З- вата

И- пенал со стеклянными пипетками

К- резиновая груша со шлангом)

Процесс рассева включает следующие стадии (показаны стрелками):

1. Открывание емкости с питательной средой и помещение туда стеклянной пипетки.

Pass5.jpg

2. Перенесение определенного количества питательной среды в сосуды Карреля со знаком «+».

3. Рассев клеточной суспензии из сосудов с «+» в сосуды с «-».

??? - А как рассчитать необходимое количество среды, вносимое в сосуды Карреля со знаком «+»?

Уместный вопрос. Например, в сосуде с «+» Вы имеете монослой (это примерно 1,2 млн. клеток в мл). Вы решили рассеять монослой пополам. Предположим, что Ваш сосуд Карреля имеет полезный объем около 10 мл. Учтем, что новый сосуд, в который Вам надо переселять часть клеток, тоже имеет объем 10 мл. Поэтому в суспензию с трипсином (сосуд «+») мы наливаем 20 мл среды, чтобы затем 10 мл клеточной суспензии перенести в сосуд Карреля со знаком «-», а остальные 10 мл оставить в «старом» сосуде.

Итак, после того, как все сосуды со знаком «+» залиты рассчитанным количеством среды, можно приступать к рассеву клеточной суспензии в новые сосуды.

Pass4.jpg

Стеклянная пипетка погружается в сосуд со знаком «+». Клеточная суспензия набирается в пипетку (приблизительно до половины ее высоты) и с силой выпускается обратно в сосуд. Эта операция продлевается несколько раз для того, чтобы дезагрегировать клеточные кластеры и обеспечить в дальнейшем равномерный рассев клеток и прикрепление их к субстрату.

Pass2.jpg

Затем половина объема среды (в нашем примере 10мл) из сосуда Карреля с суспензией переносится в новый сосуд.

Pass1.jpg

Сосуды Карреля и бутылки со средой закрываются над пламенем горелки. Пересев клеток закончен.

В процессе пересева после трипсинизации Вы можете ОЦЕНИТЬ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ, т. е. *подсчитать* общее количество клеток, а также выявить в их числе мертвые и живые клетки. Для этих целей существует простой метод подсчета клеток в гемоцитометре (камере Горяева).

Подготовка гемоцитометра

В клеточную суспензию добавляют равный объем 0,1%-ного трипанового синего. Этот краситель окрашивает только мертвые клетки.

Шлифованное покровное стекло притирают к предметному стеклу гемоцитометра (белая стрелка) до появления колец Ньютона, так, чтобы покрыть заштрихованные области (голубая стрелка).

Kamera.jpg

Это приводит к образованию камеры с фиксированным объемом, поскольку края предметного стекла подняты над заштрихованной поверхностью ровно на 0,1 мм. Каждая заштрихованная область состоит из 9 больших квадратов размером 1x1, т. е. объем, ограниченный каждым большим квадратом, оказывается равным 1мм x 1мм x 0,1 мм = 0,1 мм³.

Отбирают часть окрашенной суспензии пастеровской пипеткой и заполняют счетную камеру гемоцитометра, используя капиллярное всасывание, не переполняя каналы камер.

Goryaev.jpg

Подсчет живых клеток в гемоцитометре (по R.L.P. Adams)

Подсчитывают количество клеток в четырех больших квадратах в углах каждой из двух заштрихованных областей. Считают клетки, касающиеся правой и верхней ограничивающих линий, но не клетки, касающиеся левой и нижней ограничивающих линий. Поскольку объем большого квадрата составляет 0,1 мм³, то, умножив усредненное значение числа клеток в одном квадрате на 10⁴, получают количество клеток в 1 мл суспензии.

Counting.jpg

Пример. Сосчитайте клетки под объективом x10. Счет клеток проводите в четырех наборах из шестнадцати маленьких квадратов (в каждом углу центральной заштрихованной области). Считайте только неокрашенные клетки. Разделив полученное число на 4, получите среднее число клеток на 1 мм².

Поскольку высота камеры составляет 0,1 мм, то пересчетный коэффициент для гемоцитометра равен 10⁴. Предположим, что полученное значение составляет 20 клеток на 1 мм². Тогда 20x10⁴ равно числу клеток в 1 мл окрашенной трипановым синим суспензии, а 2x20x10⁴ равно числу клеток в 1 мл исходной суспензии, т. е. концентрация живых клеток в исходной суспензии составляет 4x10⁵ клеток в 1 мл.

Одним из преимуществ клеточной культуры перед другими объектами исследования является возможность продолжительного наблюдения за жизнедеятельностью клеток, за состоянием отдельных клеточных органелл, за процессами, идущими в клетках, фиксировать состояние культуры с учетом количественных и качественных параметров.

Для этих целей могут применяться *методы микроскопии клеток* (как прижизненной, так и после фиксации) и *фотографирование*.

First.jpg (подпись: Первая фотография клетки, полученная под электронным микроскопом, была сделана в 1945 году Кейтом Р. Портером, Альбером Клодом и Эрнестом Ф. Фулламом.)

Чаще всего перед наблюдением в микроскоп клетки окрашивают.

Сравните две фотографии клеточного монослоя, полученные в нашей лаборатории (линия СПЭВ). Трудно поверить, что на них одна и та же культура. Дело в том, что клетки покрашены разными красителями.

Blue.jpg (подпись: краситель метиленовый фиолетовый)

Yellow.jpg (подпись: краситель индиго)

Индиго «контрастирует» ядра клеток, а метиленовый фиолетовый структуры клетки.

Также существуют методы избирательного окрашивания структурных компонентов клетки. Приведем несколько примеров.

69246_63.jpg

(подпись: Окрашенные митохондрии в культивируемых фибробластах (краситель Родамин123. Флюорисцентная микрография. Douglas Wallace, Emory University, Atlanta))

578.jpg

(подпись: Окрашенный эндоплазматический ретикулум. Флюорисцентная микрография культивируемой клетки млекопитающего, окрашенной с помощью антител, связывающихся с белками в ЭПР. Hugh Pelham)

Paint1.jpg

(подпись: Клетка млекопитающего. Соответствие в клеточной локализации между митохондриями (слева; краситель Родамин123: прижизненное окрашивание, световая микроскопия) и микротрубочками (справа; иммунофлюорисцентная микрография после фиксации; клетка окрашена флюорисцентными антителами к микротрубочкам. Lan Bo Chen)

Paint2.jpg

(подпись: Зафиксированная окрашенная (Кумасси синий) клетка. Избирательное окрашивание белков цитоскелета. Colin Smith)

Paint3.jpg

(подпись: Фибробласт. Микротрубочки (зеленый цвет; окрашены антителами к тубулину) в интерфазе. Ядро (сине-зеленый цвет) окрашено флуоресцентным красителем к ДНК. Nancy L. Kedersha).

Существуют методы прижизненного окрашивания клеток с целью различить мертвые и живые клетки. Некоторые фирмы для этих целей выпускают специальные наборы.

Например, такие тесты предлагает фирма Molecular Probes Europe BV

Color.jpg

(подпись: PtK2 клетки, окрашенные с использованием *LIVE/DEAD EukoLight Viability Kit*, при этом мертвые клетки окрашиваются в красный цвет, а живые – в зеленый.)

ColrSprm.jpg

(подпись: Клетки бычьей спермы, окрашенные с использованием *LIVE/DEAD FertiLight Sherm Viability Kit*. Живые клетки зеленого цвета.)

МИКРОСКОПИЯ

Увеличение и разрешение

Большинство клеток можно увидеть только с помощью микроскопа. При описании размеров клеток используют микрометры и нанометры (Таблицу). Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около $1/10$ мм, или 100 мкм. Это означает, что если вы смотрите на две линии, которые находятся друг от друга на расстоянии менее чем 100 мкм, они сливаются в одну. Точно так же две точки, лежащие на расстоянии менее 100 мкм, кажутся одной расплывчатой точкой. Чтобы различить структуры, расположенные более тесно, применяют оптические приборы, например микроскопы. Лучший световой микроскоп имеет разрешающую способность около 0,2 мкм, или 200 нм, т. е. примерно в 500 раз улучшает человеческий глаз. Теоретически построить световой микроскоп с большим разрешением невозможно. Отметим, что разрешающая способность и увеличение не одно и то же. Если с помощью лучшего светового микроскопа вы получили фотографию двух линий, расположенных на расстоянии менее 0,2 мкм, то как бы вы ни увеличивали изображение, линии будут сливаться в одну. Используя более сильные линзы, можно получить большее увеличение, но не улучшить разрешение.

Трансмиссионный (просвечивающий) электронный микроскоп

Разрешающая способность электронного микроскопа почти в 400 раз больше светового. Это достигается за счет использования потока электронов вместо видимого света. Современные электронные микроскопы имеют разрешающую способность около 0,5 нм, примерно в 200 000 раз большую, чем человеческий глаз. (Диаметр атома водорода около 0,1 нм.)

В трансмиссионном (просвечивающем) микроскопе пучок электронов, проходя сквозь образец, оставляет его изображение на экране. Участки образца, пропускающие больше

электронов, т. е. «электронопрозрачные», выглядят на экране светлыми, а «электроноплотные» — темными.

Просвечивающий электронный микроскоп имеет один крупный недостаток. Электроны обладают очень маленькой массой и должны двигаться в вакууме; при этом электронный

пучок может пройти только сквозь очень тонкие образцы. Для их приготовления объект нужно зафиксировать и заключить в твердый материал, а затем по специальной методике

приготовить тонкие срезы. Следовательно, высокая разрешающая способность электронного микроскопа может быть использована для изучения только фиксированных препаратов. Поэтому очень трудно идентифицировать изменения, произошедшие в препарате во время его приготовления. Некоторые типы клеток, почти все вирусы и многие внутриклеточные структуры можно увидеть только с помощью трансмиссионного электронного микроскопа.

Сканирующий электронный микроскоп

В сканирующем (растровом) электронном микроскопе электроны, которые регистрируются и преобразуются в изображение, идут от поверхности образца. Электронный пучок фокусируется в тонком зонде и им сканируют образец. В результате этого образец испускает вторичные электроны слабой энергии. Различные участки поверхности испускают

неодинаковое количество вторичных электронов. Меньшее количество испускают углубления и борозды и поэтому кажутся темными, большее — пики и выступы, которые выглядят светлыми. В результате получают трехмерное изображение. Электроны, отраженные поверхностью, и вторичные электроны собираются, усиливаются и передаются на экран.