

***МИКРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH В ОДИНОЧНЫХ КЛЕТКАХ  
ЖИВОТНЫХ***

***Туровецкий В.Б., Пирутин С.К.***

Москва, 2018

## **Аннотация к задаче**

Микрофлуориметрический анализ с использованием флуоресцентных зондов является одним из наиболее адекватных методов исследования клеток. Благодаря наличию в его арсенале значительного числа люминесцентных красителей, создается возможность проведения многостороннего изучения механизмов, ответственных за реализацию функциональной активности клетки. Важное место при этом занимает анализ состояния ее плазматической мембраны и одной из основных систем клеточной регуляции - системы внутриклеточной рН-регуляции. Определение величин соответствующих параметров проводится с помощью флуорохромов этидиум бромид и флуоресцеиндиацетата или их аналогов. В ходе выполнения задачи студенты освоят теоретические и практические основы микрофлуориметрического метода определения рН в одиночных клетках животных.

### **План проведения задачи**

1. Вводная беседа.
2. Освоение методической разработки и знакомство с необходимой литературой.
3. Освоение методики работы на фотометрирующем люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ ИЗ.
4. Проведение измерений на эталонном флуоресцирующем стекле.
6. Проведение измерений на одиночных клетках (при наличии материала).
7. Измерение рН в буферных, калибровочных растворах флуоресцеина и построение калибровочной кривой
7. Обработка полученных данных и представление их в виде рисунков и таблиц.
8. Обсуждение полученных результатов и написание выводов.
9. Оформление отчета.
10. Сдача зачета.

## **1. Теоретическая часть.**

### 1.1 Введение.

Одной из актуальнейших задач современной биологии является изучение структурно-функциональной организации и физико-химических механизмов регуляции обмена веществ и энергии в клетке. Особая значимость работ этого направления исследований состоит в том, что расшифровка фундаментальных принципов регуляции клеточного метаболизма, помимо важного теоретического, имеет также большое практическое значение для медицины, сельского хозяйства, охраны окружающей среды, биотехнологии и др.

Успешное развитие этого направления исследований в значительной степени определяется использованием адекватных задаче физических методов, среди которых важное место по праву принадлежит методу флуоресцентных зондов. Их активное применение в последние два десятилетия показало широкие, подчас недоступные для других методов, возможности такого подхода. Это, в первую очередь, связано с возможностью проведения с помощью набора флуорохромов комплексного количественного анализа структуры и различных сторон метаболизма живой клетки.

Благодаря способности целого ряда флуоресцирующих соединений (как внутриклеточной природы, так и вводимых в клетку извне) отвечать изменением параметров флуоресценции на изменение физико-химических свойств окружения, создается возможность следить за различными параметрами клетки. К таким параметрам можно отнести: электрический потенциал на мембране, концентрацию протонов и кальция, вязкость липидного бислоя, подвижность компонентов плазматической мембраны, проницаемость клеточной мембраны и клеточную жизнеспособность, синтетическую активность клетки, состояние ее митохондриального и лизосомального аппарата и др. При этом важно отметить, что количество специально синтезируемых флуорохромов, позволяющих изучать все новые стороны клеточного метаболизма, постоянно растет.

На сегодняшний день существует два варианта применения метода флуоресцентных зондов: флуориметрия клеточных суспензий и микрофлуориметрия одиночных клеток. В последние годы флуоресцентные зонды все более активно применяются при изучении одиночных клеток. Как показывают результаты этих исследований, такой подход оказывается значительно более информативным, чем флуориметрия клеточных суспензий, и позволяет проводить более тонкий анализ механизмов функционирования клетки, в частности, даже на уровне отдельных внутриклеточных органелл. Существенно важным достоинством микрофлуориметрического метода является также и то, что для проведения исследований требуются минимальные количества биологического материала. Это особенно важно в условиях, когда по тем или иным причинам количества его ограничены, как, например, в

случае использования клинического материала в научно-исследовательской работе и при постановке флуоресцентных диагностических тестов, которые получают все более широкое применение в медицине. Возможности микрофлуориметрического анализа были в значительной степени расширены благодаря разработке и развитию конфокальной флуоресцентной микроскопии, обеспечившей возможность регистрации сигналов флуоресценции с трехмерным субмикронным разрешением [ 9 ].

Таким образом, метод флуоресцентных зондов дает уникальную возможность проведения многостороннего анализа механизмов, ответственных за реализацию функциональной активности клетки. Применение такого подхода при наличии соответствующего оборудования и флуорохромов позволяет осуществлять полный комплекс исследований, начиная от простой регистрации изменений в величине одного из параметров клетки при действии исследуемого фактора и кончая расшифровкой ответственных за наблюдаемый биологический эффект физико-химических механизмов.

Принципиально важное значение при этом имеет анализ влияния исследуемых факторов на состояние плазматической мембраны и основные системы регуляции клеточных функций. К их числу, наряду с  $Ca^{2+}$ - и цАМФ-мессенджерными системами, в настоящее время относят систему внутриклеточной рН-регуляции, которая, как показано, играет важную роль в реализации различных сторон функциональной активности клетки, связана с другими системами регуляции и, по мнению ряда авторов, может даже претендовать на роль ключевой регуляторной системы клетки [4,11,18].

В связи с вышеизложенным, **целью настоящей задачи** является освоение теоретических и практических основ микрофлуориметрического метода определения внутриклеточного рН.

В рамках малого практикума данная задача является ознакомительной. Основным **методом исследования** будет являться зондовый микрофлуориметрический метод анализа одиночных клеток с использованием отечественного фотометрирующего люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ ИЗ (Ленинград, ЛОМО).

## 1. 2. Проблема внутриклеточной рН-регуляции.

Интерес к проблеме участия внутриклеточного рН в реализации функциональной активности клетки возник задолго до того, как были разработаны достаточно чувствительные технические средства его регистрации. Использование же на протяжении многих лет неадекватных методов определения данного параметра привело к формированию ошибочного мнения о неизменности цитоплазматического рН клеток в различных метаболических состояниях. Следствием этого явилось заключение о том, что рН не может являться фактором, участвующим в

регуляции клеточных функций. И лишь в последние годы в связи с разработкой более совершенных методов исследования появилась реальная возможность изучить истинную роль рН в реализации функциональной активности клетки [4,11,18]. Среди этих методов ведущее место занимает флуориметрический метод с использованием оптических рН-индикаторов, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью и практически не травмирующий клетку [15,24]. Использование микрофлуориметрического варианта метода позволило перейти к исследованию отдельных клеток, структуры клеточных популяций по данному параметру, и даже к изучению топографии значений рН в пределах одиночной клетки [3,15,23].

Благодаря активному применению флуоресцентных зондов, в последние годы удалось показать, что многие процессы, происходящие в клетке при изменении ее функционального состояния, так или иначе связаны с изменением внутриклеточного рН [11]. К их числу относятся адгезия и слияние клеток, изменение их формы, формирование цитоскелета, транспорт ионов и низкомолекулярных соединений, активность клеточного метаболизма, процессы пролиферации и др. Регистрируемые при этом сдвиги величины внутриклеточного рН составляют обычно 0.1-0.2 ед., однако, в ряде случаев они достигают единицы рН. Несмотря на обилие подобного рода данных, конкретные механизмы участия изменений внутриклеточного рН в регуляции клеточных функций еще до конца не ясны и активно изучаются в настоящее время. Регуляторная роль ионов водорода может, по-видимому, реализовываться как за счет непосредственного их влияния на активность ферментов, так и опосредованно, через изменение физико-химических характеристик мембран и активность  $\text{Ca}^{2+}$ - и цАМФ-зависимых систем клеточной регуляции. В общей проблеме внутриклеточной рН-регуляции важное место принадлежит вопросу о конкретных механизмах, ответственных за поддержание и связанные с изменением функционального состояния сдвиги рН в клетке. Концентрация ионов водорода в клетке определяется мощностью ее буферных систем (фосфаты, бикарбонаты, органические кислоты и их соли, амино- и карбоксильные группы белков), процессами, сопровождающимися утилизацией или выделением протонов (гликолиз, цикл трикарбоновых кислот, синтез и гидролиз АТФ), а также их транспортом через плазматическую мембрану клетки и мембраны клеточных органелл. При этом, как полагают, ведущая роль среди механизмов рН-регуляции в клетке принадлежит различным системам транспорта ионов водорода через плазматическую мембрану (сопряженный с другими ионами перенос протона и система транспортных  $\text{H}^+$ -АТФаз) [4,18]. Наибольшее внимание в последние годы привлекает к себе система электронейтрального  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена, обнаруженная у многих типов клеток [14]. При этом показано, что возрастание внутриклеточного рН, наблюдаемое при действии на клетку целого ряда физиологически активных агентов, происходит в результате усиления  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена. В активации обменника принимают участие протеинкиназа С и диацилглицерол, образующийся в результате гидролиза мембранного

фосфолипида фосфатидилинозитола. Предполагается также, что система  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  обмена принимает участие не только в регуляции рН клетки, но и в выведении из нее ионов  $\text{Na}^+$ , регуляции клеточного объема и др.

Таким образом, хотя на сегодняшний день многие аспекты проблемы внутриклеточной рН-регуляции еще до конца не ясны, имеющиеся данные указывают на то, что ионы водорода, наряду с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  и цАМФ, играют, по-видимому, важную роль в регуляции функциональной активности клетки.

### 1.3. Флуориметрический метод определения внутриклеточного рН с использованием флуоресцеиндиацетата.

Среди существующих в настоящее время флуориметрических методов определения внутриклеточного рН наибольшее применение находит метод с использованием флуоресцеиндиацетата (ФДА). Принцип метода состоит в том, что незаряженная, бесцветная молекула флуоресцеиндиацетата легко проникает из окружающего раствора внутрь клетки, где внутриклеточные эстеразы расщепляют ее до флуоресцеина, находящегося при разных значениях рН в разных формах, спектральные характеристики которых существенно различаются (рис.1) [15,20,24]. Образовавшийся в клетке флуоресцеин в достаточной степени медленно "вытекает" в окружающую среду [22], что создает условия для проведения длительных измерений. Регистрация отношения интенсивностей флуоресценции окрашенных клеток в двух соответствующих длинах волн спектра испускания позволяет получить параметр, величина которого зависит от рН внутри клетки, но не от концентрации флуоресцеина в ней [3,15]. Определение значения внутриклеточного рН проводится по калибровочной кривой (величина параметра против соответствующего значения рН раствора). При этом, важно отметить, что искажения в определении рН, которые могут быть внесены изменением состава буфера и его ионной силы, а также присутствием белка (до 0.2 г альбумина в мл) в растворе, крайне малы [3,23]. Существенно также, что, судя по предварительным оценкам [15], при использовании стандартной микрофлуориметрической техники пространственное разрешение метода может достигать 1 мкм при временном разрешении до 300 мсек.

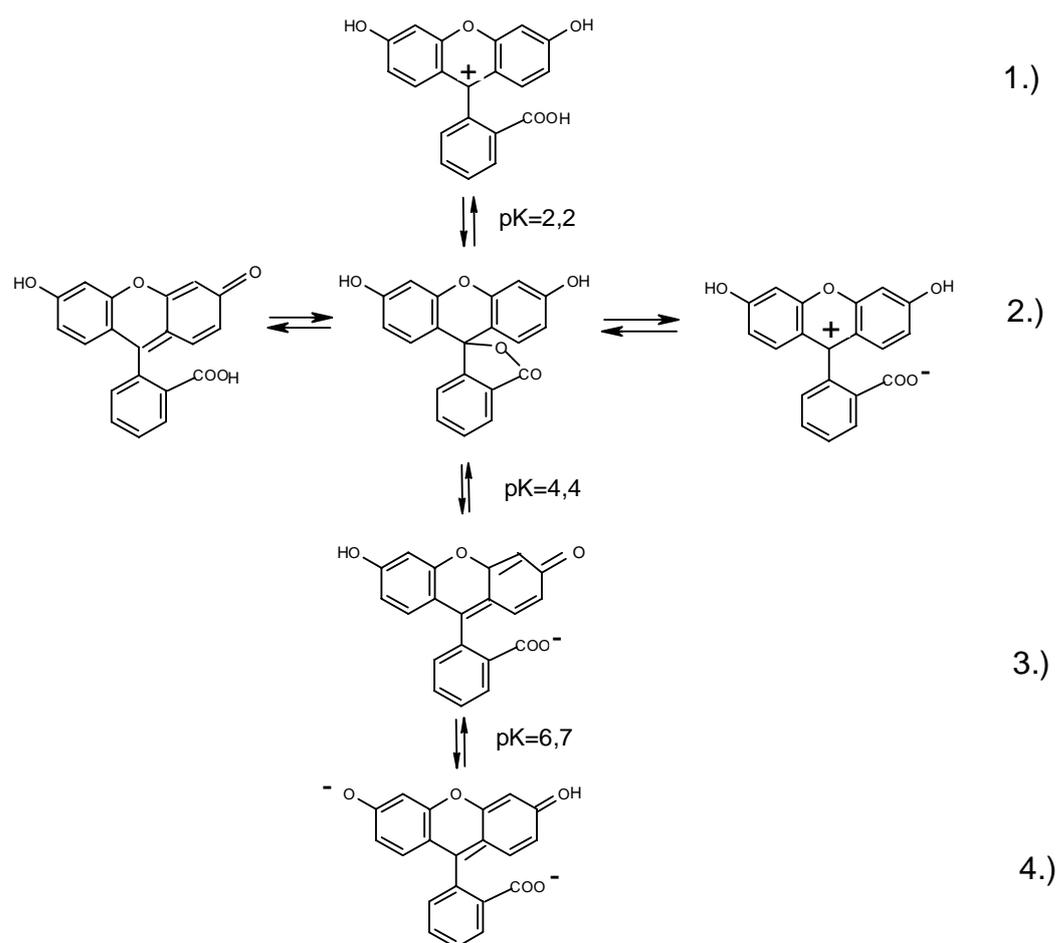


Рис.1. Формы флуоресцеина в зависимости от pH раствора.

1.) – катион, 2.) – нейтральная молекула, 3.) – моноанион, 4.) – дианион.

### Литература.

1. Андреев А.И., Самарин С.Н., Туровецкий В.Б., Рубин А.Б., Влияние перекиси водорода на перитонеальные нейтрофилы мышей.// Вестн. Моск. ун-та, сер.16. Биология, 1999, №4, стр.35-37.

2. Гальчук С.В., Туровецкий В.Б., Андреев А.И., Буравкова Л.Б. Влияние аргона и азота на перитонеальные макрофаги мышей и их устойчивость к повреждающему воздействию УФ-облучения in vitro.// Авиакосмическая и экологическая медицина, 2001, т.35, №3, стр. 39-43.

\*3. Литинская Л.Л., Векслер А.М., Иконникова Н.И., Туровецкий В.Б., Козлов Д.А., Хруст Ю.Р. Микроскопический вариант прижизненной рН-метрии индивидуальных клеток с использованием флуоресцеиндиацетата.// Рукопись деп. в ВИНТИ 19.07.84, № 5267-84 Деп.

\*4. Литинская Л.Л., Векслер А.М., Туровецкий В.Б. Пространственно-временная гетерогенность внутриклеточного рН как способ регуляции функционального состояния клетки.// Рукопись деп. в ВИНТИ 25.03.87, № 2144-B87.

5. Пархоменко И.М., Перишвили Г.В., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б., Бровко Л.Ю.// Влияние малых доз ионизирующей радиации на внутриклеточный рН, содержание АТФ и синтетическую активность культивируемых фибробластов китайского хомячка.// Радиобиология, 1993, т. 33, вып. 1, стр. 104-110.

6. Туровецкий В.Б., Породина Н.Б., Ерин А.Н., Молнар Е.М., Сухих Г.Т. Влияние пептидного экстракта фетальных тканей мозга на внутриклеточный рН перитонеальных фагоцитов мышей.// Бюлл. эксперим. биол. и медиц., 1995, №12, стр. 626-630.

7. Туровецкий В.Б., Погосян С.И., Золотилин С.А., Мартин Карабайо М.А. Влияние излучения He-Ne-лазера на функциональную активность и внутриклеточный рН перитонеальных фагоцитов мыши.// Биол. мембраны, 1992, т. 9, № 10-11, стр. 1172-1174.

8. Туровецкий В.Б., Золотилин С. А., Сарычева Н.Ю., Калихевич В.Р., Каменский А.А. Влияние тафцина на функциональную активность и внутриклеточный рН перитонеальных макрофагов мышей.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1994, № 3, стр. 265-267.

9. Феофанов А.В. Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях.// Успехи биол. химии, 2007, т.47, стр.371-410.

10. Black L., Berenbaum M.C. Factors affecting the dye exclusion test for cell viability.// Exp. Cell Res. , 1964, v.34, 9-13.

\*11. Busa W.B., Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH.// Amer. J. Physiol., 1984, vol. 246, № 4, p. R409-R438.

\*12. Dankberg F., Persidsky M. A test of granulocyte membrane integrity and phagocytic function.// Criobiology, v.13, 430-432, 1976.

13. Edidin M.A. A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies.// J. Immunology, 1970, v. 104, p. 1303-1306.

14. Grinstein S., Rothstein A. Mechanisms of regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger.// J. Membrane Biol., 1986, v. 90, p. 1-12.

15. Heiple J.M., Taylor D.L. An optical technique for measurement of intracellular pH in single living cells.// In: Intracellular pH: Its Meas., Regul., and

Util. in Cell. Functions. Ed. by R. Nuccitelli and D.W. Deamer. New York: Lis. 1982, p. 21-54.

16. Hudson L., Hay F.C. Practical immunology. Blackwell scientific publications. Oxford, 1980, P.29-31.

17. Khodorov B., Valkina O., Turovetsky V. Mechanisms of stimulus-evoked intracellular acidification in frog nerve fibres.// FEBS letters, 1994, v. 341, p. 125-127.

18. Madshus T.H. Regulation of intracellular pH in eukaryotic cells.// Biochem. I, 1988, vol. 250, p. 1-8.

19. Martel J.L., Jaramillo S., Allen F.M., Rubinstein P. Serology for automated cytotoxicity assay.// Vox Sang, 1974, v. 27, p.13-20.

\*20. Martin M.M., Lindqvist L. The pH dependence of fluorescein fluorescence.// J. Luminescence, 1975, vol. 10, p. 381-390.

21. Mishell B.B., Shiidi S.M. Selected methods in cellular immunology.// Freeman and Co. San Francisco, 1980, p. 16-19.

\*22. Rotman B., Papermaster B.W. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1966, vol. 55, p. 134-141.

23. Slavik J. Intracellular pH of yeast cells measured with fluorescent probes.// FEBS letters, 1982, vol. 140, № 1, p .22-26.

24. Thomas J.A., Buchsbaum R.N., Zimniak A., Racker E. Intracellular pH measurements in Erlich ascites tumor cells utilising spectroscopic probes generated in situ.// Biochemistry, 1979, vol. 18, p. 2210-2218.

25. Turovetsky V.B., Andreev A.I., Buravkova L.B., Rubin A.B. The influence of short term gravity changes on mouse spleen lymphocytes in vitro (microfluorimetry with probes).// Journal of gravitational physiology, 1998, vol. 5(1), p. P153-P154.

**Литература, рекомендуемая для прочтения** при подготовке отчета по выполненной работе, отмечена звездочками (ксерокопии соответствующих статей прилагаются).

## **2. Материалы и методы исследования.**

### **2.1. Объект исследования.**

В данном курсе наличие клеточного материала не является обязательным т.к. задача является ознакомительной по теме – «Микрофлуориметрический анализ животной клетки».

Объект исследования главным образом являются перитонеальных макрофагах беспородных белых мышей-самцов. Перитонеальные макрофаги получают вымыванием клеток из брюшной полости только что забитых животных (без стимуляции пептоном) раствором Хенкса (содержащим 10 мМ HEPES, pH 7.2), из расчета 2 мл на мышшь. Примерная концентрация клеток в полученной суспензии доводят раствором Хенкса до концентрации  $10^6$  клеток в 1 мл.

Небольшие объемы суспензии (30 мкл) наносят на покровные стекла, инкубируют 45 мин во влажной камере, а затем покровные стекла промывают раствором Хенкса для удаления непривившихся клеток. Полученные вышеописанным способом препараты прикрепившихся к стеклам перитонеальных фагоцитов находятся в течение эксперимента в растворе Хенкса.

Введение в клетки люминесцентного pH-индикатора флуоресцеина осуществляют в результате инкубации фагоцитов, посаженных на стекла, с флуоресцеиндиацетатом (в конечной концентрации 5 мкг/мл) в течение 10 мин. После отмывки от несвязавшегося красителя покровные стекла помещают в специально изготовленную камеру, заполняют ее раствором Хенкса и проводят измерения интенсивности флуоресценции отдельных клеток.

Для приобретения практического навыка работы на микроскопической установке и освоения метода – «микрофлуориметрического определения внутриклеточного pH» вместо живого объекта (клетки-макрофаги), используется эталонное **флуоресцирующее стекло - ЖС-19**.

Построение **калибровочной кривой** проводится спомощь измерения флулуоресценции раствора флуоресцеина с в фосфатных буферных растворах с известной величиной pH в интервале 5 – 8 ед. pH.

## 2. 2. Микрофлуориметрическое измерение внутриклеточного pH.

Определение внутриклеточного pH проводят с использованием варианта микрофлуориметрического метода на серийно выпускаемом люминесцентном микроскопе марки ЛЮАМ ИЗ (рис.2), оснащенном фотометрической насадкой ФМЭЛ-1А с набором интерференционных светофильтров, фотоумножителем ФЭУ-79 и цифровым вольтметром Щ-4300. Возбуждение флуоресценции осуществляют с использованием галогенной лампы накаливания КГМ9-70 и комбинации светофильтров ФС1-4 и СЗС21-2.

Регистрацию интенсивности флуоресценции клеток в двух узких полосах спектра излучения флуоресцеина проводят, используя встроенные в насадку ФМЭЛ-1А интерференционные светофильтры с максимумами пропускания в  $\lambda_1=520$  нм и  $\lambda_2=567$  нм. Диаметр фотометрируемого участка препарата составляет 12.5 мкм. Систематический контроль за постоянством параметров оптического тракта микроскопа, системы усиления и

регистрации сигнала проводят с использованием технического флуоресцирующего эталона из стекла ЖС-19.

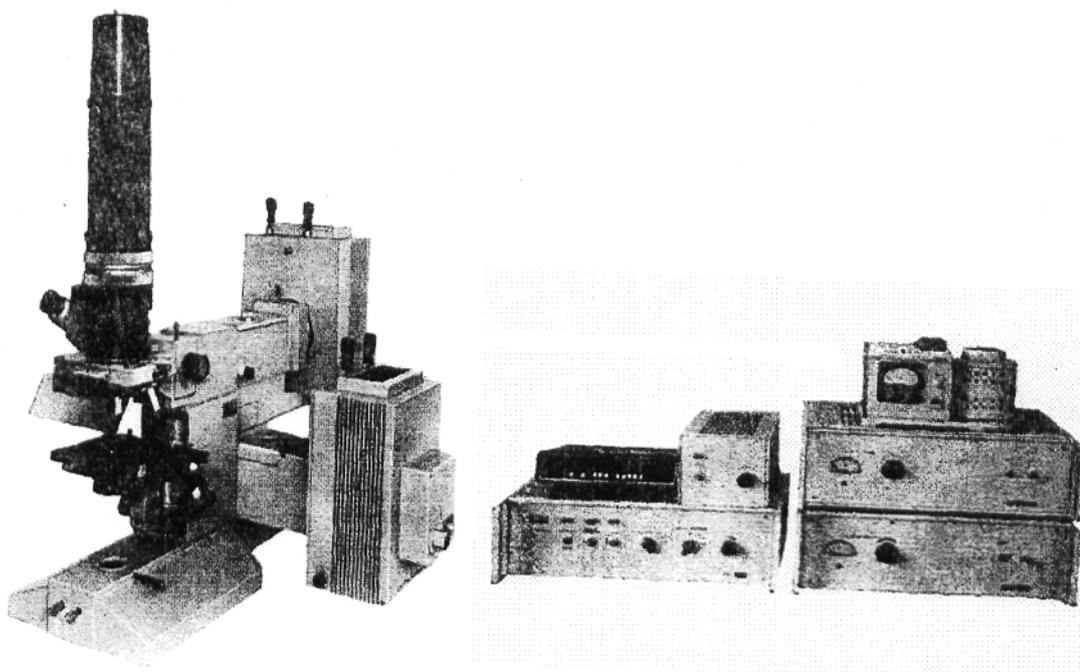


Рис.2. Люминесцентный исследовательский микроскоп ЛЮМAM-ИЗ.

Для проведения измерений препарат окрашенных клеток устанавливают на предметный столик микроскопа и проводят регистрацию показаний милливольтметра Щ-4300 сначала при  $\lambda = 520$  нм, затем при  $\lambda = 567$  нм, и снова при  $\lambda = 520$  нм. Полученные показания прибора пропорциональны интенсивности флуоресценции клеток в соответствующих областях спектра и обозначаются соответственно  $I_1$ ,  $I_2$  и  $I_3$ .

Расчет параметра  $K$ , пропорционального величине рН, проводят по следующей формуле:

$$K = \frac{(I_1 + I_3)}{2 \cdot I_2}$$

### 2.3. Порядок работы на микрофлуориметрической установке.

*(к работе на установке допускаются лица, обученные и аттестованные на знание правил техники безопасности, применяемых при эксплуатации установок с напряжением свыше 1000 В).*

#### 2.3.1. Подготовка установки к работе.

1. Включить блок питания галогенной лампы накаливания Б 5-21 (при использовании лампы КГМ 9-70 ток лампы должен составлять 7.5 А).

2. Проверить, закрыт ли затвор перед ФЭУ в фотометрической насадке ФМЭЛ-1А.

3. Включить высоковольтный блок питания ФЭУ УБПВ-1:

а) Установить переключатель выходного напряжения в соответствующее положение.

б) Включить тумблер СЕТЬ на передней панели блока. При этом загорается соответствующая сигнальная лампа.

в) Включить тумблер ВЫСОКОЕ НАПРЯЖЕНИЕ. При этом загорается соответствующая сигнальная лампа.

г) Через 2 мин проверить по индикатору наличие тока нагрузки. При перегрузке загорается сигнальная лампа ПЕРЕГРУЗКА. В этом случае надо уменьшить ток нагрузки и нажать кнопку СБРОС. В результате этого схема придет в исходное состояние.

4. Включить согласующий прибор рН-340 (время его прогрева - 20 мин).

5. Включить цифровой измерительный прибор Ц-4300 в режиме регистрации напряжения постоянного тока в диапазоне 2В.

**ВНИМАНИЕ!** Прибор включается последним при подготовке всей установки к работе, а выключается по окончании работы первым.

6. Проверить наличие соответствующих светофильтров (ФС 1-4 и СЗС 21-2) в канале возбуждающего света.

7. Установить в ход лучей объектив 40<sup>x</sup>.

8. Сфокусировав микроскоп на поверхность флуоресцирующей эталонной пластины, проверить центрировку прикрытой полевой диафрагмы микроскопа относительно фотометрического зонда.

9. Перед началом работы установка должна прогреться в течение 30 мин.

### 2. 3. 2. Порядок проведения измерений.

1. Подготовленный к измерениям препарат клеток, окрашенных флуоресцентным зондом, раствор флуоресциина в фосфатном буфере или эталонное **флуоресцирующее стекло - ЖС-19** поместить на предметный столик микроскопа.

2. Открыть защитную шторку перед источником возбуждающего света.

3. Открыть апертурную и полевую диафрагмы.

4. Вращением рукояток грубого и тонкого вертикального перемещения столика провести фокусировку микроскопа на изображение объекта в свете его флуоресценции или в проходящем свете.

5. Вращением рукояток горизонтального перемещения столика совместить выбранный для изучения объект с темным пятном (фотометрическим зондом) в поле зрения.

6. Закрывать полевую диафрагму до размера зонда.

7. Провести измерение интенсивности флуоресценции объекта в двух соответствующих длинах волн его спектра испускания:

а) Поворотом двух дисков насадки ФМЭЛ-1А с вмонтированными в них интерференционными светофильтрами выставить против окулярного тубуса комбинации цифр "8" и "0" или "0" и "11". При этом в оптическую систему канала регистрации флуоресценции вводятся интерференционные светофильтры с максимумами пропускания при  $\lambda_1=520$  нм и  $\lambda_2=567$  нм, соответственно.

б) После установки каждой из указанных комбинаций цифр на дисках предварительно при закрытом затворе с помощью рукоятки ТЕМПЕРАТУРА РАСТВОРА согласующего прибора рН-340 произвести компенсацию до нулевого значения показаний цифрового вольтметра Щ-4300, обусловленных наличием темнового тока.

в) Открыть затвор перед ФЭУ и снять отсчет показаний (мВ) по измерительному прибору Щ-4300 с записью полученных значений в регистрационный журнал для дальнейших обчислений.

### 3. Экспериментальная часть.

#### 3.1. Измерение флуоресценции эталонного стекла - ЖС-19.

Измерить флуоресценцию эталонного стекла при двух длинах волн  $\lambda = 520$  нм –  $I_1$ , затем при  $\lambda = 567$  нм –  $I_2$ , и снова при  $\lambda = 520$  нм –  $I_3$ . Передвигая предметный столик в двух взаимно перпендикулярных направлениях, случайным образом, сделать таких как описано выше 8 измерений.

Расчет параметра  $K$ , по следующей формуле:

$$K = \frac{(I_1 + I_3)}{2 \cdot I_2}$$

Расчитать среднее значение  $K$  и ошибку средних для этого параметра.

#### 3.2. Построение калибровочной кривой в растворе.

Калибровочная кривая в растворе представляет собой график зависимости величины параметра  $K$  (отношение интенсивностей флуоресценции в области длин волн  $\lambda_1=520$  нм и  $\lambda_2=567$  нм) раствора двуназатриевой соли флуоресцеина ( $5 \times 10^{-5}$ М) в 0.1 М фосфатном буфере от величины его рН в интервале от 6.0 до 8.0 ед.

$$K = I_{520} / I_{570} = f(\text{pH})$$

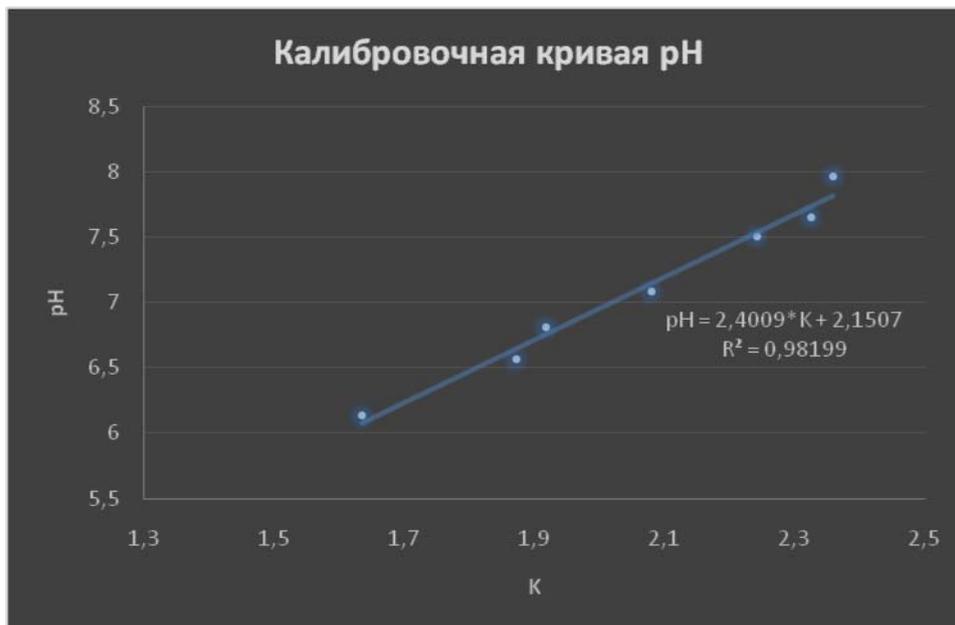


Рис.3. Калибровочная кривая – зависимость величины параметра  $K = (I_1 + I_3) / I_2$  от значения pH раствора.

### 3.3. Определение внутриклеточного pH

В препараты макрофагов на покровных стеклах, опущенных в чашки Петри (2 мл) с раствором Хенкса (содержащим 10 мМ HEPES, pH 7.2), вводят флуоресцеиндиацетат (ФДА) в конечной концентрации 5 мкг/мл. Клетки инкубируют с флуорохромом 10 мин, после чего отмывают один раз выше описанным раствором от не связавшегося красителя. После проникновения ФДА в клетки они обретают зеленую флуоресценцию уже заряженного флуоресцеина – рис.4. Для определения внутриклеточного pH, также как описано ранее, измеряют флуоресценцию в клетках при двух длинах волн и определяют –  $K$ . По калибровочной кривой определяют значения pH. Для точного определения внутриклеточного pH к полученному значению pH прибавляют 0,2 ед. pH.

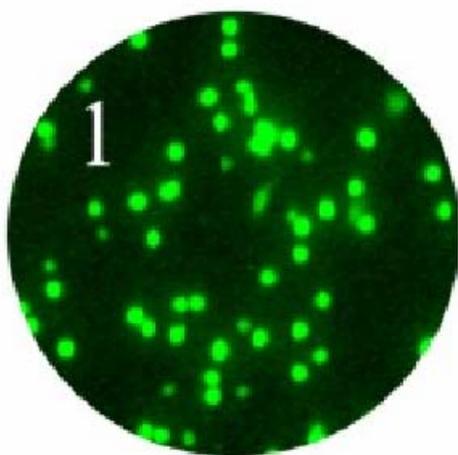


Рис.4. Перитонеальные мышечные макрофаги с заряженным флуоресцеином.

### **Сдача зачета по выполненной работе.**

**Отчет по выполненной работе** должен содержать (в письменной форме):

1. Введение;
2. Цель и задачи исследования;
3. Методы исследования;
4. Статистически обработанные данные проведенных экспериментов, представленные в виде рисунков и таблиц;
5. Обсуждение полученных результатов;
6. Выводы по полученным результатам;
7. Список использованной при работе литературы.

**Сдача зачета по выполненной работе** проходит (при наличии письменного отчета) в виде беседы с преподавателем.

#### **Вопросы по задаче.**

1. Основные принципы микрофлуориметрического анализа живых клеток в помощь флуоресцентных зондов.
2. Аппаратура, используемая при флуориметрическом анализе клеток.
3. Флуоресцентные зонды.
4. Основные достоинства и недостатки метода зондовой микрофлуориметрии клеток.
5. Роль рН в регуляции функциональной активности клеток.
6. Измерение внутриклеточного рН с помощью флуоресцеиндиацетата (введение красителя в клетку и построение калибровочной кривой).