

• **Культивирование отдельных (одиночных) клеток**

- Отдельные клетки культивируют для получения клонов, изучения их генетической и физиологической изменчивости или стабильности. Кроме того, культивирование отдельных клеток позволяет изучать условия, определяющие возникновение стимулов к делению у клеток, изолированных от влияния других клеток популяции или ткани. Отдельные клетки также важны для клоновой селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. Обычно в такие клетки вводят маркерные гены, которые позволяют осуществлять селекцию.
- Кроме того, отдельные клетки могут служить моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и изолированной клетке. Например, для изучения фотодыхания.

- Работа с изолированными одиночными клетками складывается из двух этапов:
- 1) изолирование неповрежденной клетки растительной или каллусной ткани;
- 2) создание условий, благоприятных для роста и развития изолированной клетки.

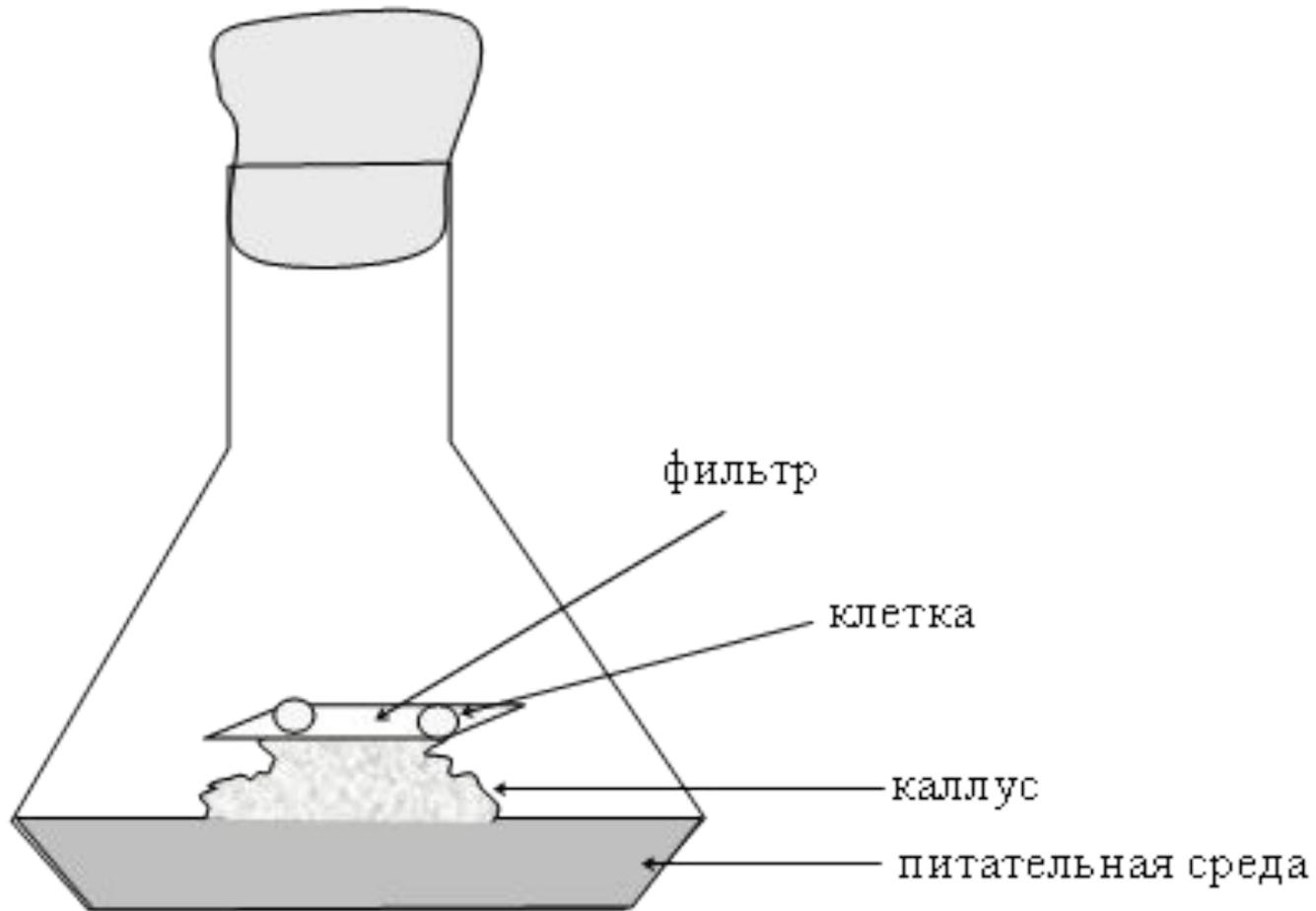
- На первом этапе необходимо выделить неповрежденную и жизнеспособную клетку из ткани целого растения или каллусной ткани.
- Этого возможно достичь разными путями:
- 1. Отдельные клетки можно получать из ткани целого растения путем ее мацерации. Для получения отдельных мацерированных клеток используются специальные мацерирующие ферментные препараты, содержащие пектолитические ферменты, поливинилпирролидон, сульфат калия, сорбит (маннит), 2-N-морфолиноэтансульфоновую кислоту. Данная процедура производится в условиях строгой стерильности.
- Мацерированные клетки ткани растения являются хорошей моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и отдельной клетке. Однако процесс мацерации может привести к утрате способности отдельных клеток к последующим делениям.

- 2. Удобнее получать отдельные клетки из суспензионных культур с использованием микроманипулятора, проточного цитофлюориметра или путем последовательных разбавлений. В этом случае суспензии готовятся разными способами: 1) либо 1-2 мл суспензии отбирают из супернатанта после оседания основной массы клеток, 2) либо суспензию фильтруют через фильтры с уменьшающимся диаметром пор.
- Для последовательных разведений используют платы для микротитрований, что позволяет микроскопически контролировать клеточный состав при последовательных разведениях.
- Получение одиночных клеток на основе суспензионных культур связано с меньшим риском повреждения по сравнению с выделением непосредственно из тканей растения.
- 3. Отдельные клетки могут быть получены из рыхлых каллусов при помощи микроманипуляторов.
- 4. Идеальными отдельными клетками являются протопласты, образовавшие клеточную стенку.

- При первых же попытках культивирования отдельных клеток стало ясно, что они ведут себя иначе, чем их скопления в виде агрегатов в суспензии или каллусной массы на поверхности питательной среды.
- Возникла важная научная проблема: как заставить делиться клетки, изолированные от влияния других клеток популяции или тканей.
- Было предложено несколько вариантов культивирования отдельных клеток.

- Впервые подобрать условия, подходящие для деления отдельных клеток, удалось в 1954 году **Мьюиру, Хильденбрандту и Райкеру**. Этот способ получил название *метода «ткани – няньки»*.
- При этом клетку изолируют из рыхлого каллуса непосредственно на кусочек фильтра, помещенный за 2-3 дня до изолирования на верхушку каллусной ткани, из которой была взята клетка. В качестве «няньки» можно также использовать каллусную ткань другого растения родственного вида. В любом случае каллус должен находиться в фазе активного роста. Только тогда клетки способны расти и делиться.
- По мере старения каллуса-няньки фильтр с клетками переносится на молодой каллус. При достижении колонией, выросшей из отдельной клетки, размера 0,5-1 мм, она может быть перенесена для дальнейшего выращивания на агаризованную питательную среду непосредственно либо на фильтр, помещенный на поверхность питательного агара.

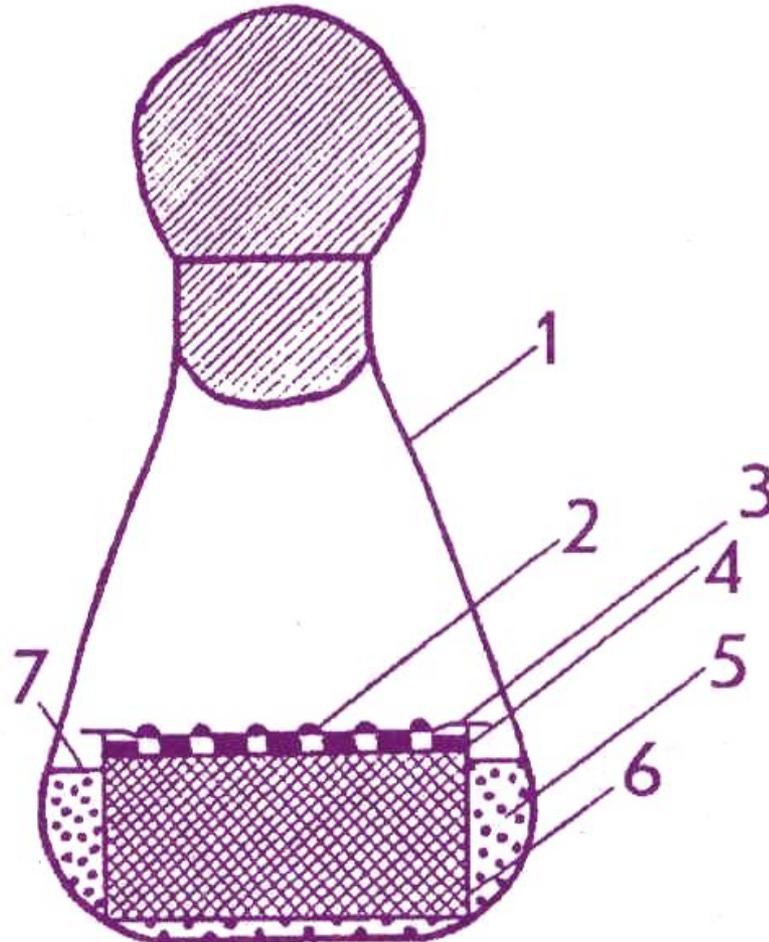
- Метод «ткани-няньки»



- Другой вариант культивирования одиночных клеток на основе метаболитов делящихся клеток – *метод кондиционирования среды*. В этом случае используют культуральную жидкость длительно выращиваемой суспензионной культуры. При этом клеточную суспензию для удаления клеток фильтруют через бактериальный фильтр, после чего фильтрат (среду с метаболитами) добавляют в среду для культивирования одиночных клеток.

- Можно также использовать *метод «кормящего слоя»*. Для этого в качестве кормящего одиночные клетки слоя берут суспензию клеток того же вида, что и одиночная клетка, или близкого вида. Клеточная суспензия должна находиться в ранней экспоненциальной фазе ростового цикла.

- Рис. Использование «кормящего слоя» (суспензионная культура) при выращивании колоний из одиночных клеток: 1 - колба, 2 - колония, возникшая из отдельной клетки, 3 - фильтровальная бумага, 4 - металлическая сетка, 5 - суспензия клеток «кормящего слоя», 6 - подложка (пенополиуретан), 7 - питательная среда.



- **Метод плейтинга** был разработан для массового культивирования отдельных изолированных клеток. В 1959 г. **Бергман** предложил фильтровать суспензионную культуру (в его экспериментах это были табак и фасоль) стерильно через один слой батиста (ячейки 0,3 x 0,1 мм). В результате получали суспензию, на 90% состоящую из отдельных клеток. Эту суспензию смешивали с питательной средой того же состава, что использовался при культивировании суспензии (среда содержала 0,6% агара). Смесь разливали тонким слоем (1 мм) в чашки Петри. Агар разделял клетки, но не препятствовал обмену химическими сигналами между ними, а толщина слоя позволяла наблюдать за их поведением под микроскопом.

- **Метод микрокультуры (микрокапель)** базируется на использовании очень малых объемов очень богатой питательной среды, например, среды Као-Михайлюк. При этом объем среды, в которую помещаются клетки, должен был минимальным (микрокапли объемом до 20 мкл). Однако даже при соблюдении всех этих условий процент разделившихся клеток остается низким. Метод предложил академик Ю.Ю. Глеба. В микрокапле удобно наблюдать за получением и делением клеток при соматической гибридизации.

- **Метод микрокамеры** был разработан **Джонсом** в 1960 г., и может быть использован при оптимальной сбалансированности состава питательной среды для культивирования отдельной клетки.

Метод включает следующие процедуры: на предметное стекло с помощью жидкого парафина на небольшом расстоянии наклеивают покровные стекла; между которыми наносят квадрат из жидкого парафина; в камеру из парафина помещают каплю питательной среды с отдельной клеткой; сверху камеру накрывают еще одним покровным стеклом; за развитием клеточной колонии наблюдают под микроскопом.

- Использование микрокамеры Джонса позволило **Вэсилу** и **Хильдебрандту** в 1965 г. продемонстрировать возможность получения из изолированной клетки табака нормально развивающегося и достигшего цветения растения. Таким образом, впервые экспериментально была доказана тотипотентность клетки растения.

- Сложности культивирования отдельных клеток способствовали возникновению гипотезы о «факторе кондиционирования». Так было названо вещество или вещества, стимулирующие деление отдельных клеток. По-видимому, «фактор кондиционирования» вырабатывается самими клетками, но в небольшом количестве. И только увеличивая число клеток, вырабатывающих этот фактор, или же уменьшая объем среды, в котором выращивается клетка, можно заставить ее делиться.
- Было выяснено, что фактор кондиционирования имеет химическую природу, термолабилен, водорастворим, низкомолекулярен, видонеспецифичен, не заменяет известные фитогормоны. Однако, несмотря на многочисленные попытки определить природу веществ, индуцирующих деление отдельной клетки, и механизм действия фактора кондиционирования, данный вопрос окончательно не выяснен.

Питательные среды

Среда DMEM/F-12 в соотношении 1:1 применяется для выращивания широкого спектра клеточных культур. Изначально среда F12 была разработана для бессывороточного культивирования

СНО клеток, клеток легких и мышинных L-клеток. В связи с богатым содержанием питательных веществ в среду DMEM/F12 можно добавлять относительно небольшое количество эмбриональной

бычьей сыворотки (FBS—fetal bovine serum), либо использовать без сыворотки, но тогда необходимо добавлять такие факторы, как инсулин, трансферин, эпидермиальный фактор роста и др..

Среда RPMI-1640 была разработана в Roswell Park Memorial Institute (откуда и берет свое название) в 1966 Муром и его коллегами для культивирования лейкоцитов. В настоящее время используется для широкого спектра клеточных культур.

Среда IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) - это модификация среды DMEM, содержащая селенит натрия, добавочные аминокислоты и витамины, пируват натрия, ХЕПЕС и нитрат калия вместо нитрата железа. Среда IMDM используется для поддержания культуры клеток В лимфоцитов, В клеток, стимулированных полисахаридами, Т лимфоцитов и гибридом.

Среда 199 первоначально была разработана для поддержания культуры первичных эксплантов. В настоящее время среда 199 применяется для продукции вакцин, культивирования первичных эксплантов и

тканей хрусталика. Изначально среда 199 готовилась с солями Эрла, но есть модификация среды 199 с солями Хэнкса.

Среды F-12 и F-10 изначально были разработаны Хэмом (Ham's nutrient mixture) для культивирования СНО клеток, HeLa и мышинных L-клеток. Обе среды были разработаны для бессывороточного культивирования.

Среда F-12 применяется для культивирования широкого спектра клеток млекопитающих и гибридом.

Среда Грейса (Grace's Insect Media) применяется для поддержания клеточных линий, полученных от бабочек и некоторых двукрылых.

Среда Шнейдера (Schneider's Insect Media) изначально разрабатывалась для дрозофилы, но может применяться и для поддержания клеточной культуры других двукрылых.

Соли Хэнкса (Hanks' Balanced Salt) изначально были разработаны для поддержания культуры клеток в атмосфере без CO_2 . Для диссоциации клеток применяются соли Хэнкса без ионов кальция и магния.

Соли Эрла (Earle's Balanced Salts) применяются для суспензионных культур, а также при проблеме слипания клеток.

Буфер фосфатный Дульбекко применяется для промывки клеток. Кальций и магний способствуют слипанию клеток; фосфатный буфер без кальция и магния используют для суспензионных культур.