

Z Katedry Fizyki Ogólnej Wydziału Mat. Fiz. Chem. UMCS

Kierownik: prof. dr Armin Teske

Jadwiga SKIERCZYŃSKA

**Pomiary potencjału elektrycznego i oporu błon komórek *Hookeria lucens*
za pomocą mikroelektrod ***

Измерения электрического потенциала и сопротивления мембран клеток
Hookeria lucens с помощью микроэлектродов

Measurements of the Electric Potential and of the Cell Resistance
of *Hookeria lucens* with Microelectrodes

Istnieje szereg publikacji na temat pomiarów wielkości elektrycznych błon pojedynczej komórki roślinnej. Ostatnio pomiary te przeprowadzane są niemal wyłącznie za pomocą mikroelektrod. Technikę tę niektórzy zaczynają stosować również do badań komórek umieszczonych w tkance, ale prac tego typu jest zaledwie kilka (patrz [5]); za pomocą mikroelektrod badane były komórki koleoptyla *Avena sativa* przez Ethertona i Higinbothama [1, 2, 3, 4]. Sibaoka zastosował mikroelektrody do pomiaru potencjałów spoczynkowych i czynnościowych komórek mimozy [6]; Sinclair, badając stosunki jonowe w komórkach *Hookeria lucens*, użył mikroelektrody do określenia potencjału tych komórek [7].

Niniejsza praca stanowi jeszcze jedną próbę zastosowania mikroelektrod do badania komórek tkanki. Celem pracy był pomiar napięć i oporów błon komórkowych, przede wszystkim zaś określenie wartości oporu międzykomórkowego.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

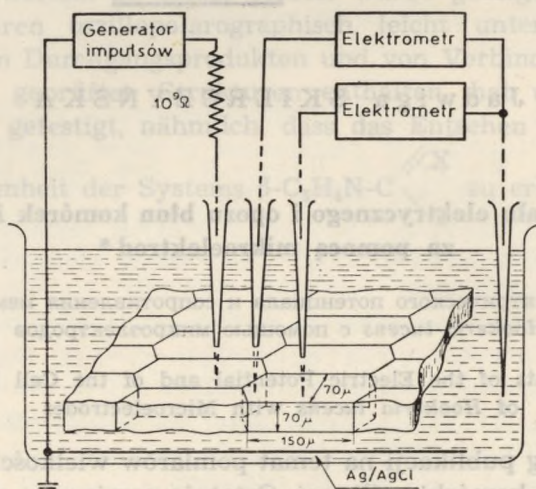
MATERIAŁ I METODA POMIARU

Materiałem badanym były liście mchu *Hookeria lucens*. Liście te posiadają interesującą strukturę: zbudowane są z monowarstewki komórek, z których wszystkie mają prawie jednakowy kształt i rozmiar (ryc. 1).

* Praca wykonana w East Anglia University (Norwich) w r. 1966.

Podczas pomiarów liście umieszczone były w przepływającym roztworze wodnym o składzie Na 1 mM/l, K 0,1 mM/l, Ca 0,3 mM/l i Cl 1,7 mM/l.

Umieszczanie liści *Hookeria lucens* w wodzie nie wytwarza nienaturalnych warunków, ponieważ mech ten rośnie na silnie wilgotnym



Ryc. 1. Schemat układu pomiarowego

podłożu i jego liście zawsze pokryte są cienką warstewką wody. Mikroelektrody, wykonane z pyreksu o średnicy końca 1–3 μ i napełnione 3 M KCl, połączone były z aparaturą pomiarową za pośrednictwem kalomelówek i agarowych mostków. Napięcie mierzono elektrometrem Keithley (model 603) o oporze wejściowym $> 10^{14} \Omega$, pomiar natężenia wykonywany był galwanometrem COHU (model 204 A).

Mikroelektrody wprowadzano do komórki za pomocą mechanicznego mikromanipulatora. Operację tę przeprowadzano w polu widzenia mikroskopu przy 200-krotnym powiększeniu.

Mierząc całkowity opór błon, wprowadzano do komórki (nazwijmy ją A) dwie mikroelektrody: napięciową i prądową.

Opór R określano jako stosunek $\frac{\Delta E}{i}$, gdzie ΔE — zmiana potencjału wewnątrzkomórkowego wywołana przepływem prądu i (czas trwania impulsów prądowych wynosił 1 sek.).

W celu oszacowania wartości oporu dzielącego dwie sąsiednie komórki A i B wprowadzano do sąsiedniej komórki B jeszcze jedną elektrodę napięciową.

Zgodnie z prawem Kirchoffa $\frac{R_3}{R_0} = \frac{\Delta E_3}{\Delta E}$ gdzie R_3 i R_0 — opory

elektryczne, międzykomórkowy i całkowity, które napotyka prąd przepływający przez komórkę B.

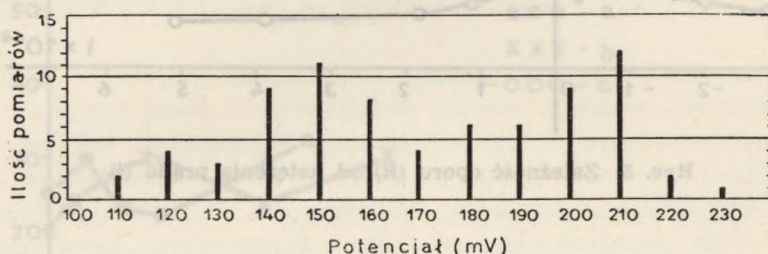
E — potencjał rejestrowany w komórce A,

E_3 — różnica potencjałów rejestrowanych w komórkach A i B,

ΔE i ΔE_3 — zmiany potencjału E i różnicy potencjałów E_3 wywołane przepływem prądu.

WYNIKI POMIARÓW

Zmierzono wartości wewnątrzkomórkowego potencjału elektrycznego E dla 77 komórek. Wykres zależności między otrzymanymi wartościami E a liczbą przeprowadzonych pomiarów wykazuje istnienie dwu maksimów: -150 mV i -210 mV (ryc. 2).



Ryc. 2. Zależność między liczbą wykonanych pomiarów (N) a wartością potencjału wewnątrzkomórkowego (E)

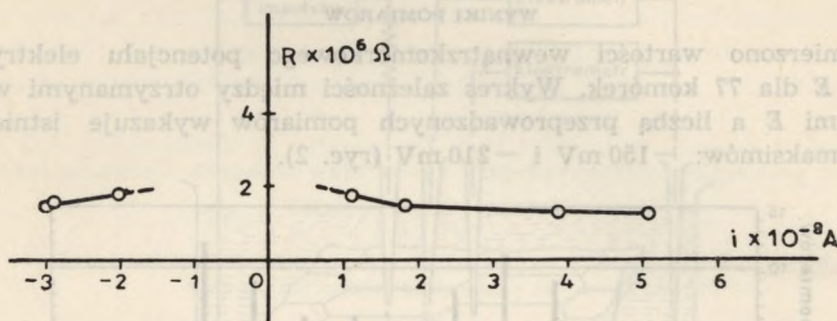
Wielkość oporu $R = \frac{\Delta E}{i}$, określono dla 8 komórek (tab. 1). Średnia wartości oporu jest równa $\sim 3 \cdot 10^6 \Omega$.

Tab. 1. Wartości potencjałów wewnątrzkomórkowych i oporów

Nr komórki	E (mV)	i ($\times 10^8$ A)	$R = \frac{\Delta E}{i}$ ($\times 10^{-6} \Omega$)
1	-200	± 5	3
2	-120	± 5	6
3	-170	± 3	3,7
4	-195	± 5	3,6
5	-120	± 2	3
6	-170	± 5	1
7	-135	± 5	5,5
8	-135	± 1	1,1
Wartość średnia			3,4

W stosowanym zakresie natężeń ($1 \cdot 10^{-8}$ — $5 \cdot 10^{-8}$ A) nie obserwowano w zasadzie wyraźnej zależności oporu od natężenia (ryc. 3).

W dwu przypadkach w chwili rozpoczęcia pomiarów zauważono opór znacznie większy (rzędu $5 \cdot 10^7 \Omega$), niezwykle szybko malejący do wartości $10^6 \Omega$. Ponieważ ta wysoka wartość oporu znacznie odbiegała od pozostałych wartości — przyjęto, że jest ona obciążona dużym błędem i w tab. 1 jej nie umieszczano.



Ryc. 3. Zależność oporu (R) od natężenia prądu (i)

Tab. 2. Oszacowanie wartości oporu międzykomórkowego R_2

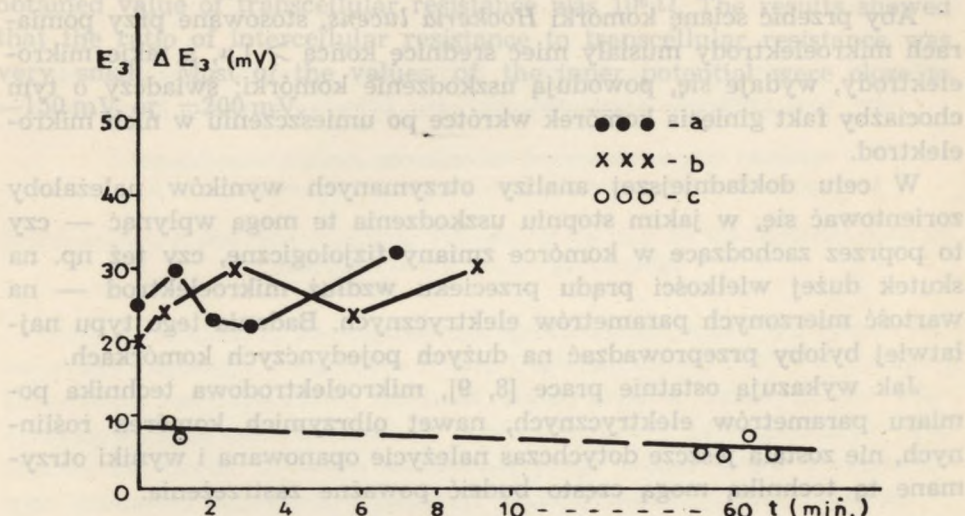
Nr komórki	$\frac{\Delta E_3}{\Delta E} = \frac{R_3}{R_0}$
1	0,08
4	0,14
5	0,06
Wartość średnia	0,09

Ze względu na trudności natury technicznej wartość $\frac{\Delta E_3}{\Delta E}$ zmierzona została tylko dla trzech par komórek (tab. 2). Średnia tych pomiarów wynosi 0,09. Wartości ΔE_3 i E_3 , wykreślone jako funkcje czasu obserwacji, podano na ryc. 4.

Po umieszczeniu w komórce dwu mikroelektrod tylko w kilku przypadkach komórka żyła parę godzin, z reguły komórki ginęły znacznie wcześniej. To było powodem, iż nie udało się — mimo szeregu prób — określić bezwzględnej wartości R_3 . Pomiar R_3 wymaga bowiem zastosowania metody czterech mikroelektrod; do każdej z dwu sąsiednich komórek winny być wprowadzane po dwie mikroelektrody: jedna prądowa i jedna napięciowa.

ANALIZA WYNIKÓW

Uzyskanie dwu maksimów na krzywej przedstawiającej E jako funkcję liczby odczytów pokrywa się z danymi z obserwacji Sinclara [7]. Najczęściej obserwowane przez niego wartości E wynosiły -140 mV i -200 mV [7]. Dwie różne wartości potencjału (-160 mV i -50 mV) obserwował w komórkach tkanki mimosy również Siboaka [6]. Tłumaczył on ten wynik różnicami w strukturze komórek; w jego obserwacjach duże komórki miały zawsze niski potencjał.



Ryc. 4. Zależność od czasu obserwacji: wartości napięcia międzykomórkowego E_3 w przypadku dwu par komórek (a, b— E_3) oraz zmian napięcia ΔE_3 wywołanego prądem $i = 10^{-8}$ A (c— ΔE_3)

W przypadku *Hookeria lucens* wszystkie komórki wydają się zupełnie identyczne, toteż wyjaśnienie proponowane przez Sinclara [7], iż jedna z otrzymanych wartości potencjału odnosi się do cytoplazmy, a druga do wodniczki, wydaje się dla tego przypadku bardziej słuszne.

Niemniej, duże rozmycie otrzymanych wartości E może budzić pewne zastrzeżenia odnośnie tej interpretacji. Nie jest wykluczone, że to rozmycie, jak również jedno z maksimów jest wynikiem artefaktów, związanych z samą metodą pomiarową.

Średnia wartość oporu dla komórek tkanki *Hookeria lucens* jest tego samego rzędu, co uzyskana dla komórek tkanki kolecyptyki owsa [3].

Mała wartość stosunku $\frac{\Delta E_3}{\Delta E}$ wskazuje, iż opór R_3 między dwiema sąsiednimi komórkami jest bardzo mały w porównaniu z oporem oddzielającym komórki od zewnętrznego środowiska.

Opór R_3 jest bardzo istotną wielkością w zagadnieniach dotyczących transportu jonów, niestety, bezwzględnej jego wartości — ze względów natury technicznej — dla komórek *Hookeria lucens* nie udało się ustalić.

Wartość tego oporu została zmierzona dla dużych komórek zielenicy *Chara australis*. Wyniki tych pomiarów są opublikowane w osobnym artykule [9].

Pomiary napięć i oporów techniką mikroelektrodową w komórkach roślinnych są znacznie trudniejsze aniżeli w komórkach zwierzęcych, ponieważ komórki roślinne pokryte są twardą ścianką celulozową.

Aby przebić ścianę komórki *Hookeria lucens*, stosowane przy pomiarach mikroelektrody musiały mieć średnicę końca $> 1 \mu$, a takie mikroelektrody, wydaje się, powodują uszkodzenie komórki; świadczy o tym chociażby fakt ginięcia komórek wkrótce po umieszczeniu w nich mikroelektrod.

W celu dokładniejszej analizy otrzymanych wyników należałoby zorientować się, w jakim stopniu uszkodzenia te mogą wpłynąć — czy to poprzez zachodzące w komórce zmiany fizjologiczne, czy też np. na skutek dużej wielkości prądu przecieku wzdłuż mikroelektrod — na wartość mierzonych parametrów elektrycznych. Badania tego typu najłatwiej byłoby przeprowadzać na dużych pojedynczych komórkach.

Jak wykazują ostatnie prace [8, 9], mikroelektrodowa technika pomiaru parametrów elektrycznych, nawet olbrzymich komórek roślinnych, nie została jeszcze dotychczas należycie opanowana i wyniki otrzymane tą techniką mogą często budzić poważne zastrzeżenia.

PISMIENICTWO

1. Etherton B., Higinbotham N.: Science, **131**, 409 (1960).
2. Etherton B.: Plant. Physiol., **38**, 581 (1963).
3. Higinbotham N., Hope A. B., Findlay G. P.: Science, **143**, 1448 (1964).
4. Higinbotham N., Etherton B., Foster R. J.: Plant. Physiol., **39**, 196 (1964).
5. Scott B. I. H.: Ann. Rev. Plant. Physiol., **18**, 409 (1967).
6. Siboaka T.: Science, **137**, 226 (1962).
7. Sinclair J.: The Ionic Relations of the Leaves of *Hookeria Lucens* (1965). Thesis.
8. Skierczyńska J.: J. Exp. Bot., **19**, 389 (1968).
9. Skierczyńska J.: J. Exp. Bot., **19**, 407 (1968).

РЕЗЮМЕ

Измерялись электрические потенциалы и сопротивления мембран клеток *Hookeria lucens*.

Полученная величина сопротивления между вакуолью и внешней средой равнялась $10^6 \Omega$. Межклеточное сопротивление по сравне-

нию с предыдущим было очень малое. Большая часть полученных величин внутреннего потенциала приближалась к -150 и -210 mV.

В работе обсуждаются полученные результаты.

SUMMARY

Measurements were made of the difference of the electric potential and of the resistance of the cell membrane of *Hookeria lucens*. The obtained value of transcellular resistance was $10^6 \Omega$. The results showed that the ratio of intercellular resistance to transcellular resistance was very small. Most of the values of the inner potential were close to -150 mV or -200 mV.

Определение первого потенциала ионизации атомов кальция методом поверхностной ионизации с применением масс-спектрометра

Determination of the First Ionization Potential of Calcium by the Surface Ionization Method, Using a Mass Spectrometer

При застосованні 90-ступінцевого спектрометра мас типу симетричного, збудованого в Кatedrze Fizyki Doświadczalnej UMCS w Lublinie, досліджено температурну залежність емісії протоків іонів Ca^+ і K^+ , отримуваних методом іонізації поверхні на розігрітому вольфрамі. До дослідів використовували термоіонічне джерело іонів з розділювальним процесом пакування і іонізації, сконструйованого автором.

Найдокладніше значення потенціалів іонізації V атомів різних елементів можна отримати методом вісн атомових. Однак в деяких випадках (наприклад, елементи групи землі рідкісні і деякі елементи променіотвірні) спектроскопія атомова не дає потрібних результатів з огляду на значну складність отриманих вісн [1].

В нинішній праці застосовано метод визначення різниці потенціалів іонізації атомів двох різних елементів, улагоджених одночасно на розігрітій поверхні металу. Метод та зв'язок між енергією іонізації атомів до електронів атомів, з яких іони утворюються, пов'язаний з доріжкою іонізації поверхні [1, 2].

Відповідно до теорії іонізації поверхні [3, 4], зв'язок між числом іонів додатних (n_+) до числа атомів нейтральних (n_0), паруються з тієї самої поверхні розігрітого іонізатора в одиниці часу, називається ступенем іонізації поверхні.

Wartość potencjału błony komórkowej E_m została wyznaczona z pomiaru prądu I_m płynącego przez błonę komórkową przy założeniu, że opór wewnętrzny komórki jest znacznie większy niż opór błony komórkowej. Wynik ten jest zgodny z wartościami uzyskanymi w innych badaniach.

Wartość oporu błony komórkowej R_m została wyznaczona z pomiaru prądu I_m płynącego przez błonę komórkową przy założeniu, że potencjał błony komórkowej jest znany. Wynik ten jest zgodny z wartościami uzyskanymi w innych badaniach.

SUMMARY

Pomiary potencjału błony komórkowej i oporu błony komórkowej zostały wykonane w komórkach *Chara australis*. Wynik ten jest zgodny z wartościami uzyskanymi w innych badaniach. Wartość potencjału błony komórkowej E_m została wyznaczona z pomiaru prądu I_m płynącego przez błonę komórkową przy założeniu, że opór wewnętrzny komórki jest znacznie większy niż opór błony komórkowej. Wynik ten jest zgodny z wartościami uzyskanymi w innych badaniach. Wartość oporu błony komórkowej R_m została wyznaczona z pomiaru prądu I_m płynącego przez błonę komórkową przy założeniu, że potencjał błony komórkowej jest znany. Wynik ten jest zgodny z wartościami uzyskanymi w innych badaniach.

W celu dokładniejszej analizy otrzymanych wyników należałoby zorientować się, w jakim stopniu uszkodzenia te mogą wpłynąć — czy to poprzez zachodzące w komórkach zmiany fizjologiczne, czy też np. na skutek dużej wielkości prądu przecieku, w wyniku mikroelektrodowa wartość mierzonych parametrów elektrycznych. Badania tego typu najłatwiej byłoby przeprowadzać na dużych pojedynczych komórkach.

Jak wykazują ostatnie prace [8, 9], mikroelektrodowa technika pomiaru parametrów elektrycznych, nawet olbrzymich komórek roślinnych, nie została jeszcze dotychczas należycie opiszona i wyniki otrzymane tą techniką mogą często budzić poważne zastrzeżenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Eberhart B., Higinbotham N.: *Science*, **131**, 466 (1959).
2. Eberhart B.: *Plant Physiol.*, **28**, 561 (1953).
3. Higinbotham N., Hope A. B., Findlay G. F.: *Science*, **133**, 1445 (1959).
4. Higinbotham N., Eberhart B., Feltz M. J.: *Plant Physiol.*, **29**, 169 (1960).
5. Smith E. I. H.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **12**, 405 (1961).
6. Sakschuk Y.: *Science*, **137**, 325 (1961).
7. Sinclair J.: *The Joule Relation of the Leaves of *Hookeria lucida** (1952). Thesis.
8. Sakschuk Y.: *J. Exp. Bot.*, **13**, 375 (1962).
9. Sakschuk Y.: *J. Exp. Bot.*, **13**, 377 (1962).

РЕЗЮМЕ

Измерения электрических потенциалов и сопротивления мембран клеток *Chara australis*.

Величина потенциала мембраны E_m была определена из измерения тока I_m , протекающего через мембрану, предполагая, что внутреннее сопротивление клетки значительно больше сопротивления мембраны. Этот результат согласуется с данными других исследований.