

УДК 576.893.195 : 591.34

© 1994

**ОЧИСТКА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЙ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА
МИКРОСПОРИДИИ NOSEMA GRYLLI SP. N.
ИЗ СВЕРЧКОВ GRYLLUS BIMACULATUS ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ
В ГРАДИЕНТЕ ПЛОТНОСТИ ПЕРКОЛЛА**

**К. В. Селезнев, И. В. Исси, В. В. Долгих, Ю. Я. Соколова,
Г. Б. Белостоцкая, О. А. Антонова**

Предлагается метод разделения и очистки внутриклеточных стадий и спор микроспоридии *Nosema grylli* sp. n., паразита жирового тела сверчков *Gryllus bimaculatus*, центрифугированием в градиенте плотности перколла.

Микроспоридии — одна из удобнейших моделей для изучения проблем внутриклеточного паразитизма. Научный интерес к этой обширной, но еще малоизученной группе в значительной степени обусловлен радикальностью перестроек в клетках зараженной ткани и в организме хозяина, вызываемых их инвазией (Исси, 1986). Накоплено большое количество данных по паразито-хозяинным отношениям, полученных методами электронной микроскопии; ряд работ посвящен изучению биохимических изменений в организме хозяина в ходе развития микроспоридий (Pavan, Basile, 1966; Kučera, Weiser, 1975, и др.).

Одна из проблем, возникающих при изучении паразито-хозяинных отношений биохимическими методами, необходимость отделения паразитарного материала от материала клетки хозяина. Кроме того, и для изучения биохимических особенностей самих паразитов необходимы методы разделения и очистки различных стадий жизненного цикла микроспоридий. В настоящее время такие методы в применении к микроспоридиям фактически отсутствуют. Все это и послужило основанием для выполнения нами данной работы.

К настоящему времени разработано значительное количество простых методов очистки спор микроспоридий. Большая часть их приведена в монографии Вавры и Мэддокса (Vavra, Maddox, 1976). Существует много оригинальных модификаций этих методов (Colle, 1970; Hostounsky, 1978; Kelly, Knell, 1979; Jouvenaz, 1981). Был предложен метод очистки центрифугированием в градиенте плотности людокса (Ludox) (Undeen, Alger, 1971; Undeen, Avery, 1983). Однако очевидно, что физиологическое состояние спор и внутриклеточных стадий развития микроспоридий различается. Для изучения биохимии паразито-хозяинных отношений необходимы также методы очистки внутриклеточных стадий их жизненного цикла. Одним из подходов к решению этой задачи можно было бы считать способ получения спороплазм из выстреливших спор (Weidner, Trager, 1973). Однако и спороплазмы представляют инвазионные, а не полноценные внутриклеточные стадии. В процессе исследований нами разработана методика очистки именно внутриклеточных стадий непосредственно из зараженного органа.

Nosema grylli sp. n.¹ — типичный представитель рода *Nosema*, образующий споры с очень толстой оболочкой, что сказывается на увеличении их веса и плавучей плотности. Стадии заселяют всю клетку, кроме ядра.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили сверчки *Gryllus bimaculatus*, зараженные микроспоридией *Nosema grylli*, любезно предоставленные сотрудниками инсектария ИЭФиБ им. И. М. Сеченова РАН.

Чтобы не убивать насекомое, сбоку на брюшке делали небольшой надрез, пинцетом захватывали часть выступающего жирового тела и на покровное стекло наносили мазок для приготовления «живого» препарата. Мазки исследовались под световым микроскопом. К очистке приступали лишь при достаточно большом содержании стадий мерогонии и ранней спорогонии.

Преспорогональные стадии микроспоридий в световом микроскопе выглядят как нежные изящные шарики диаметром 5—7 мкм с двумя пузырьковидными ядрами внутри, их бывает трудно разглядеть на фоне сильно преломляющих свет спор и капелек жира. Признаком сильного заражения может служить чрезмерно раздутое и мягкое на ощупь брюшко насекомого. При значительном содержании спор жировое тело становится белоснежным, однако большое количество спор не свидетельствует о достаточном количестве стадий. Очистка стадий производилась при +4°. Плавучая плотность определялась с использованием маркеров плавучей плотности (Pharmacia).

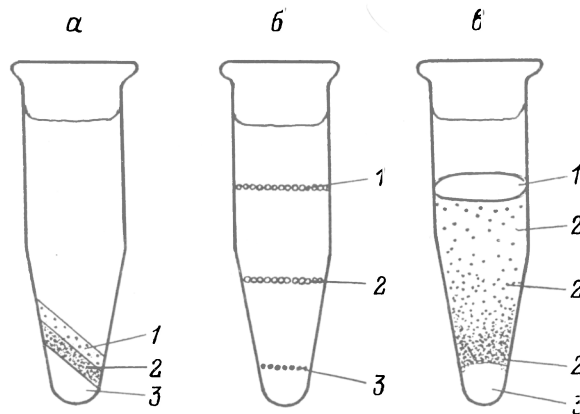
Для получения необходимых нам результатов была проведена серия экспериментов по разделению внутриклеточных стадий микроспоридий центрифугированием в градиенте плотности перколла (Percoll, Pharmacia) с различным разведением от 15 до 100 %. Опытным путем установлены оптимальные концентрации перколла и режимы центрифугирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для осуществления разделения и очистки различных стадий жизненного цикла микроспоридий предлагается следующий метод.

1. Прецентрифугирование перколла для создания градиента плотности. Для очистки стадий мерогонии и ранней спорогонии использовали 20%-ный перколл (от исходной концентрации) на 150 мМ фосфатносолевом буфере (буфер ФСБ: 138 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 1.5 мМ KН₂PO₄, 8 мМ Na₂HPO₄, pH 6.8, ДИАплюс), для разделения стадий спорогонии использовали 50%-ный перколл на 150 мМ ФСБ в объеме 1.2 мл. Центрифугирование производилось на среднескоростной центрифуге К-24 (MLW) в угловом роторе в центрифужных пробирках (Eppendorf) на 14 500 об./мин (17 000 g) 20 мин. Этого времени вполне достаточно для проведения следующих пяти операций.
2. Вскрытие сверчка и препарирование жирового тела в 150 мМ ФСБ.
3. Гомогенизация отпрепарированного органа в 1 мл ФСБ в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком.
4. Фильтрация через шприц с вставленной ватной пробкой и одновременно через фильтр для грубых осадков (Filtrak), закрепленный в держателе (Swinpex-25, Millipore) в эппендорфовскую пробирку.

¹ Описание нового вида микроспоридии будет приведено в статье Соколовой Ю. Я. с соавторами «Новая микроспоридия. *Nosema grylli* sp. n. из сверчка *Gryllus bimaculatus* De Geer» (in press).



Результаты последовательного центрифугирования при разделении стадий жизненного цикла микроспоридий.

a — первое центрифугирование: 1 — верхняя зона со стадиями мерогонии и ранней спорогонии, некоторым количеством ядер и мелких везикул. 2 — средняя зона — молодые споры, ядра клеток хозяина и остатки цитоплазмы клеток хозяина. 3 — нижняя «белая» зона из чистых зрелых спор; *б* — распределение маркеров плавучей плотности (Fargasia) в градиенте плотности 20%-го перколла: 1 — 1.016 г/мл, 2 — 1.033 г/мл, 3 — 1.062 г/мл; *в* — распределение стадий жизненного цикла после центрифугирования в градиенте плотности 20%-го перколла: 1 — стадии мерогонии и ранней спорогонии микроспоридий. 2 — молодые споры различной зрелости. 3 — зрелые споры.

Results of successive centrifugation in the process of separation of developmental stages of microsporidians.

5. Центрифугирование отфильтрованной суспензии на настольной центрифуге с угловым ротором на 1000 об./мин 4 мин.

В результате этой операции образуется трехслойный осадок (см. рисунок, *a*). Верхний слой, как правило, самый тонкий, содержит многочисленные стадии мерогонии и ранней спорогонии, некоторое количество ядер клеток хозяина и мелкие везикулы, возможно, представляющие собой фракцию цитоплазматических мембран клеток хозяина и паразита. Средний слой содержит молодые споры, в значительной части которых хорошо различимы внутренние структуры, некоторое количество стадий мерогонии микроспоридий, ядра клеток хозяина и остатки цитоплазмы клеток хозяина. Нижний слой белого цвета содержит чистые зрелые споры с неразличимыми внутренними структурами и сильно преломляющей свет оболочкой.

6. Супернатант отбирается для работы с растворимой фракцией белков клеток хозяина, а на осадок наносится около 200 мкл ФСБ, затем аккуратно отслаивается и отбирается автоматической пипеткой верхний слой полученного осадка.

7. Центрифугирование в градиенте плотности перколла на 2000 об./мин в течение 10 мин на настольной центрифуге Т-62 (MLW) в бакет-ротаторе.

При центрифугировании верхнего слоя (*a*) в 20%-ном перколле в районе, соответствующем плотности 1.016 г/мл (*б*), образуется хорошо отличимая зона белого цвета (*в*), содержащая стадии мерогонии и ранней спорогонии, некоторое количество ядер клеток хозяина и мелких везикул.

При центрифугировании среднего слоя (*a*) в 50%-ном перколле молодые споры распределялись в соответствии со своей плавучей плотностью в зависимости от зрелости в диапазоне плотности от 1.033 по 1.139 г/мл.

При центрифугировании нижней «белой» зоны (*a*) в 50%-ном перколле большая часть зрелых спор образует осадок на дне пробирки.

8. Автоматической пипеткой отбирается нужная зона (*a*) и отмывается от перколла двумя центрифугированиями в ФСБ.

Одна из проблем, возникающих при очистке, — примеси. В гомогенате жирового тела присутствует большое количество мелких везикул, возможно, представляющих собой фракцию цитоплазматических мембран. Они обладают той же плавучей плотностью, что и деспоровые стадии микроспоридий, и если допустить их до этапа центрифугирования в перколле, то избавиться от этой примеси становится практически невозможно. Очистка от везикул должна быть произведена на этапе первого центрифугирования. Нами использован следующий простой способ. Первое центрифугирование проводили на 1000 об./мин несколько раз (как правило, около 5 раз) по 1 мин с микроскопическим контролем после каждой остановки. Для этого автоматической пипеткой отбирали несколько микролитров супернатанта из области в непосредственной близости от образующегося осадка. Когда верхняя зона достигала размеров, достаточных для выделения, а в супернатанте оставалось такое количество деспоровых стадий, которое было не жаль потерять, супернатант отбрасывался, а с осадком поступали так, как описано выше.

Второй компонент примеси — незначительное количество ядер клеток хозяина. Поэтому для исследования биохимических особенностей самих микроспоридий мы предлагаем следующий путь. После отмывки очищенных стадий и последующего центрифугирования к осадку добавляется лизирующий буфер (20 мМ Tris HCl pH 7.5, 20 мМ NaCl, 0.1 мМ EDTA, 0.1%-ным NP-40, 0.5 мМ PMSF). Осадок ресуспендируется и выдерживается при +4° 20 мин, после чего центрифугируется на 8000 об./мин 10 мин. В результате этих операций нежные мембраны преспорогональных стадий жизненного цикла микроспоридий разрушаются и содержимое их цитоплазмы выходит наружу. Ядра при таком способе обработки не разрушаются (Збарский, 1988). Супернатант содержит растворимую фракцию цитоплазматических белков микроспоридий, осадок — ядра клеток жирового тела и микроспоридий. Необходимо отметить, что лишь незначительная часть ядер образует примесь в выделяемой фракции пролиферативных стадий микроспоридий. В одном из опытов нам удалось получить фракцию чистых ядер из жирового тела незараженных сверчков. Ядра образовали хорошо отличимую зону в градиенте плотности 50%-го перколла у самого дна центрифужной пробирки в районе плотности, превышающей 1.139 г/мл, в то время как стадии микроспоридий останавливаются в зоне плотности 1.016 г/мл.

Предлагаемый метод очистки стадий жизненного цикла микроспоридий прост, занимает около 1 ч и может стать рутинным при проведении биохимических исследований.²

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Фонда фундаментальных исследований.

Список литературы

- Збарский И. Б. Организация клеточного ядра. М.: Медицина, 1988. 368 с.
Исси И. В. Микроспоридии как тип паразитических простейших // Протозоология. Л., 1986. Вып. 10. С. 6—137.
Cole R. J. The application of the «triangulation» method to the purification of Nosema spores from insect tissues // J. Invertebr. Pathol. 1970. Vol. 15. P. 193—195.
Hostounsky Z. A new method for the purification of microsporidian spores // J. Protozool. 1978. Vol. 25, N 3, part 1. P. 37. A. Abstr. 109.

² Коллектив авторов выражает глубокую благодарность сотрудникам отдела клеточных культур Цитологического института РАН Маргулису Б. А., Киневу А. В., Воронину А. П., сотрудникам ИЭФиБ им. И. М. Сеченова РАН Шемаровой И. В. и Озерскому П. В., без чьей помощи и советов данная работа не могла бы быть осуществлена.

- Jouvenaz D. P. Percoll: An effective medium for cleaning microsporidian spores // J. Invertebr. Pathol. 1981. Vol. 37. P. 319.
- Kelly J. F., Knell J. D. A simple method of clearing microsporidian spores // J. Invertebr. Pathol. 1979. Vol. 33. P. 252.
- Kucera M., Weiser J. The different course of lactate and glutamate dehydrogenases activity in the larvae of *Barathra brassicae* (Lepidoptera) during microsporidian infection // Acta Entomol. Bohemoslov. 1975. Vol. 72, N 6. P. 370—373.
- Pavan C., Basile R. Chromosome changes induced by infection of microsporidia in tissues of *Rhynchosciara angelae* // Science. 1966. Vol. 151, N 3717. P. 1556—1558.
- Undeen A. H., Alger N. E. A density gradient method for fractionating microsporidian spores // J. Invertebr. Pathol. 1971. Vol. 18. P. 419—420.
- Undeen A. H., Avery S. W. Continuous flow-density gradient centrifugation for purification of microsporidian spores // J. Invertebr. Pathol. 1983. Vol. 42. P. 405—406.
- Vavra J., Maddox J. V. Methods in microsporidology // Comparative pathobiology. Biology of the microsporidia. N. Y.; London: Plenum Press, 1976. Vol. 1. P. 281—319.
- Weidner E., Traeger W. Adenosine triphosphate in the extracellular survival of an intracellular parasite (*Nosema michelis*, Microsporidia) // J. Cell. Biol. 1973. Vol. 57. P. 586—591.

Всероссийский институт защиты растений,
С.-Петербург—Пушкин

Поступила 12.02.1994

PURIFICATION OF DEVELOPMENTAL STAGES OF THE MICROSPORIDIA *NOSEMA GRYLLI* SP. N. FROM THE CRICKET *GRYLLUS BIMACULATUS* BY CENTRIFUGATION IN PERCOL DENSITY GRADIENT

K. V. Seleznev, I. V. Issi, V. V. Dolgikh, J. J. Sokolova, G. B. Belostotskaya,
O. A. Antonova

Key words: Microsporidia, *Nosema grylli*, developmental stages, purification, percol density gradient.

S U M M A R Y

The new method of isolation and purification of presporogonial stages; young and mature spores of microsporidia *Nosema grylli*, a parasite of the cricket fat body has been evaluated. The proposed method includes the consequence of following operations: (1) fat body preparation: (2) homogenizing of fat body in glass homogenizer with teflon pestle: (3) filtration through cotton wad and filter paper: (4) first centrifugation in phosphate buffered solution: (5) second centrifugation of the chosen zone contents in Percoll density gradient and (6) washing of the isolated fraction. The first centrifugation divides the sediment to the following zones: the upper layer consists of merogony and early sporogony stages, slight amount of host cell nuclei and small vesicles; the intermediate layer consists of young spores, nuclei and host cell cytoplasmic debris; the lowest layer consists of pure mature spores. After centrifuging in Percoll gradient the merogony and early sporogony stages stop in the zone with Percoll density 1.016 g/ml. Mature spores sediment on the very bottom of centrifuging tube: young immature spores are distributed through the whole tube from 1.016 g/ml up to the bottom in correspondence with their maturing grade. All purification steps take approximately 1 hour, are simple enough and may become the routine procedure while biochemical studies on microsporidia.