

## КЛОНИРОВАНИЕ ЛЕЙШМАНИЙ НА СТАДИИ ПРОМАСТИГОТЫ С ПОМОЩЬЮ МИКРОМАНИПУЛЯТОРА ФОНБРЮНА

А. Н. Алексеев, В. М. Сафьянова

Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского и ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР, Москва

Разработан метод клонирования штаммов лейшманий на стадии промастиготы (из культур, выращиваемых на двухфазовой питательной среде) с использованием микроманипулятора Фонбрюна, который полностью обеспечивает получение культур лейшманий из одной клетки этих простейших. При клонировании штаммов лейшманий, выделенных от экспериментально и естественно зараженных москитов *Phlebotomus papatasi* и *Ph. caucasicus*, оказалось, что процент получения клонов из изолированных промастигот, посеянных на питательную среду, определяется абсолютным и относительным возрастом культуры, а также свойственной данному штамму интенсивностью роста на питательной среде.

В настоящее время стало очевидным, что успешное экспериментальное решение основных вопросов эволюции и таксономии лейшманий лежит на пути создания и изучения клонов этих паразитов — генетически однородных популяций, происходящих от одной изолированной клетки. Клонирование лейшманий имеет и большое практическое значение. Так, например, данные серологии (Сафьянова, 1966, 1967) позволяют предполагать, что штаммы лейшманий, выделяемые от естественно зараженных москитов, имеют смешанную природу, т. е. включают в себя паразитов, относящихся к различным видам. Возможность такой смешанной инфекции обеспечивается способностью некоторых видов москитов питаться на различных хозяевах (на человеке, диких и домашних млекопитающих, рептилиях и проч.) на протяжении одного гонотрофического цикла. Таким образом, точная идентификация москитных штаммов невозможна без клонирования и последующего изучения серологических свойств клонов. Однако методы клонирования лейшманий до сих пор не были разработаны. Целью настоящего сообщения является описание методики получения клонов лейшманий. Для получения клонов лейшманий мы применили методику выделения отдельных промастигот из культуры на двухфазной питательной среде<sup>1</sup> с помощью микроманипулятора Фонбрюна (Фонбрюн, 1951).

### ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОВ

Для выделения клонов использована масляная камера<sup>2</sup> (рис. 1), заполненная стерильным вазелиновым маслом. Вблизи переднего края камеры с помощью оттянутой в капилляр пастеровской пипетки помещается капля обогащающей жидкости диаметром 1.5—2 мм. Позади нее и по бокам размещаются под покровным стеклом 7—10 капель меньшего диаметра, в 2—3 ряда, в шахматном порядке. Другой пипеткой в боль-

<sup>1</sup> Кровяной NNN-агар и обогащающая жидкость (лактозо-пептонная смесь, приготовленная по рецепту Кузнецовой, 1952).

<sup>2</sup> Стекла с углублением приданы к комплекту микроманипулятора Фонбрюна.

шую каплю вводят культуру лейшманий,<sup>3</sup> отчего объем капли должен увеличиться не более чем в 1.5—2 раза.

Масляную камеру фиксируют на столике микроскопа, и в поле зрения устанавливают край капли с подвижными промастиготами. Увеличение объектива, достаточное для этой работы:  $\times 10$  или  $\times 20$ .

Для извлечения из капли культуры отдельной промастиготы используют изготовленную на микрокузнице Фонбрюна петлю. Изготовленная по Шоутену петля (рис. 2) не обязательно должна иметь строго определенный диаметр, однако наилучший результат достигается тогда, когда внутренний диаметр петли в 3—5 раз больше размера продольной длины тела промастиготы ( $\approx 75$ — $125$  мкм).

Петлю вводят в масляную камеру (точнее, манипулируя столиком микроскопа, камеру «надвигают» на петлю) и погружают под край капли с культурой.

Наметив подлежащую выделению клетку, петлю поднимают, вводя во внутрь капли так, что намеченная клетка оказывается внутри петли. Петлю с захваченной промастиготой выводят в полость масляной

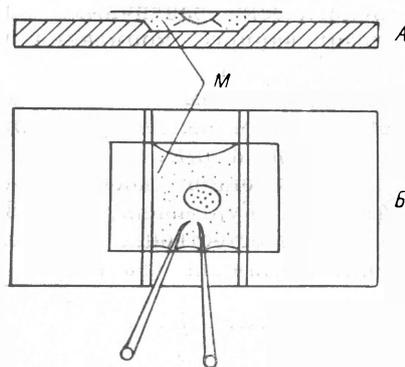


Рис. 1. Масляная камера.

А — вид сбоку; Б — вид сверху; М — масло (по Фонбрюну, 1951).

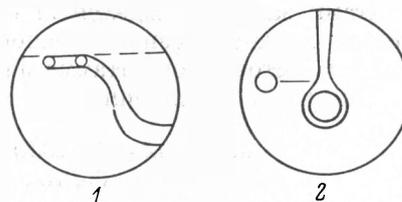


Рис. 2. Стеклопелю для извлечения одной промастиготы из капли с культурой в масляной камере.

1 — вид сбоку; 2 — вид сверху (по Фонбрюну, 1951).

камеры, погружая ее и одновременно выводя за край капли (движение «наискосок»).

Изменив фокус микроскопа, проверяют наличие в петле промастиготы и отсутствие захвата «лишних» особей. Для этого следует сменить объектив на  $\times 20$  и усилить освещение. Снова сменив объектив на прежний, перемещают манипулятором столика камеру так, что петля оказывается под серединой одной из капель с обогащающей жидкостью. Петлю вводят в каплю и убеждаются, что именно одна промастигота покинула пределы петли и свободно движется в капле жидкости. После этого петлю выводят из капли.

В отличие от рекомендаций Фонбрюна, касающихся клонирования бактерий, мы не оставляем промастиготы в этих каплях для последующего деления, так как убедились, что они в масляной камере не размножаются и довольно быстро погибают.

Вследствие этого для получения клонов содержимое каждой капли с заведомо одной промастиготой отсасывают отдельной, оттянутой в капилляр пастеровской пипеткой и с соблюдением условий стерильности выдувают в заранее заготовленную пробирку с питательной средой. Пробирки затем инкубируют при  $22$ — $25^\circ\text{C}$  и через 7—10 дней первый раз проверяют на наличие роста клона.

Масляную камеру после удаления очередной капли вновь помещают на столик микроскопа. С помощью однажды подготовленной камеры может быть произведено выделение 7—10 (иногда, при удачном размеще-

<sup>3</sup> Если культура лептомонад содержит много клеток в единице объема, то ее следует предварительно развести в 5 или 10 раз.

нии капель под покровным стеклом, 10—12) клонов. Каждый раз по окончании работы с данной масляной камерой производится отсасывание и посев на питательную среду (в качестве контроля) содержимого капли с культурой. С одной камерой можно работать не более 2—2.5 час., так как на границе обогащающей жидкости и масла образуется пленка, осаждающаяся на петле и мешающая как выделению, так и последующему высвобождению промастигот.

За рабочий день может быть выделено до 20, максимум 25 клонов. Более длительная, свыше 5 час., работа с прибором не желательна: снижается точность движений, ломаются петли и т. п.

Для получения клонов нами были использованы различные штаммы лейшманий, выделенные от москитов, естественно и экспериментально зараженных. Один из них (условное название Ph<sub>43</sub>) обладал заведомо смешанной природой. Он был выделен от самки *Phlebotomus papatasi*, последовательно зараженной двумя серологически различными видами лейшманий. Путем принудительного дозированного кормления через капилляр (Алексеев и Сафьянова, 1966) с интервалом от 1 до 3 дней самка была накормлена промастиготами вирулентного штамма *L. tropica major*, выделенными от больного кожным лейшманиозом человека, и затем — культурой промастигот, выделенной от степной агамы.

Штамм за № 66 выделен от естественно зараженного москита *Ph. papatasi* из очага зоонозного кожного лейшманиоза (Туркмения, Имам-баба). Наконец, источником штамма № 3—219 явился естественно зараженный *Ph. caucasicus*, отловленный на территории Туркмении (Захмет).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ КЛОНИРОВАНИЯ ПРОМАСТИГОТ РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ

Из таблицы видно, что число культур, выросших из клонированных клеток, весьма варьирует (от 0 до 55.5%) и зависит как от абсолютного и относительного возраста культуры, из которой выделяют клон, так, по-видимому, и от свойств штамма лейшманий. При прочих более или менее равных условиях наибольшее число клонов получено из штамма

Выделение клонов из культур различных штаммов лейшманий  
в зависимости от абсолютного и относительного возраста культуры

Штамм	Число пересевов	Возраст культуры		Количество клонов			Примечание
		абсолютный *	относи- тельный**	по- сеяно	выделено в виде культур		
					абсо- лютно	в %	
Ph <sub>43</sub>	8	252—277	6	7	2	28.5	В контроле в 2 случаях из 4 куль- тура не росла
	10—11	384—395	15—25	22	4	18.2	
			3	14	3	21.4	
	15—16	532	6—30	21	0	—	
14—36			46	0	—		
№ 66	114	3227—3232	5—7	17	7	41.0	
			11—14	16	8	50.0	
			25	9	5	55.5	
			29—30	25	2	4.0	
№ 3—219	37	1130	20	9	1	11.1	
	45	1438	23	6	0	—	
	47	1481—1490	5	8	1	12	
			15—21	70	5	7.1	
		24	13	3	23.0		

\* В сутках с момента выделения штамма до клонирования.

\*\* В сутках с момента последнего посева до клонирования.

от москита *Ph. papatasi* (№ 66). Четкую зависимость выделяемости клонов от абсолютного и относительного возраста культуры лейшманий можно проследить на примере выделения клонов из экспериментально полученной смеси разных видов лейшманий, пассированных через организм москита *Ph. papatasi* (Ph<sub>43</sub>). Чем старше (от момента выделения из москита) культура, тем труднее получить из нее клоны, и тем меньше должен быть относительный возраст культуры для успешного клонирования. При одновременном увеличении абсолютного и относительного возраста культуры (до 6—30 суток и 14—36 суток соответственно) не удавалось не только выделять клоны, но иногда и получить паразитов в контрольных посевах.

Клоны из штамма, полученного от *Ph. papatasi* (№ 66), успешно выделялись при относительном возрасте культуры 25 дней, однако при дальнейшем увеличении возраста культуры (до 30 дней) высеваемость резко упала, несмотря на небольшую разницу в абсолютном возрасте культуры.

Для штамма, выделенного от *Ph. caucasicus*, не отмечено снижение количества выделяемых клонов в зависимости от увеличения абсолютного и относительного возраста культуры. Даже напротив, из старых культур лучше выделялись клоны при сравнительно высоком относительном возрасте (20—24 дня).

#### Л и т е р а т у р а

- А л е к с е е в А. Н., С а ф ь я н о в а В. М. 1966. Метод принудительного заражающего кормления москитов (подсемейство Phlebotominae) дозированными количествами культуры лептонад. Мед. паразитолог. и паразитарн. болезни, 35 (1) : 49—52.
- К у з н е ц о в а А. А. 1952. Устойчивость лейшманий к шютеллированию. Изв. АН ТуркмССР, 6 : 73—75.
- С а ф ь я н о в а В. М. 1966. Серологическое сравнение штаммов лептонад, выделенных от москитов, с *Leishmania tropica* и лептомонадами рептилий. Мед. паразитолог. и паразитарн. болезни, 35 (6) : 686—696.
- С а ф ь я н о в а В. М. 1967. Москиты (Phlebotominae) и лейшмании (*Leishmania*). В кн.: Биологические взаимоотношения кровососущих членистоногих с возбудителями болезней человека. М., Изд. «Медицина», 246—286.

---

#### CLONING OF LEISHMANIA AT THE PROMASTIGOTE STAGE BY VONBRÜN MICROMANIPULATOR

A. N. Alekseev, V. M. Safjanova

#### S U M M A R Y

A method was worked out for cloning *Leishmania* strains at the promastigote stage from cultures reared on two-phase nutrient medium by means of Vonbrün micromanipulator. By this method cultures of *Leishmania* can be obtained from one cell of these protozoans. During the cloning of *Leishmania* strains isolated from experimentally and naturally infected *Phlebotomus papatasi* and *Ph. caucasicus* the per cent of obtaining the clones from isolated promastigotes cultivated on a nutrient medium depends on the absolute and relative age of culture and on the growth intensity of the strain on a nutrient medium.

---