

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОТЕ-КОНТРАСТИРОВАНИЯ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ НА ПРИМЕРЕ МИКРОСПОРИДИЙ (PROTOZOA: MICROSPORIDIA)

© А. А. Миллер, А. В. Симакова

Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета;  
электронный адрес: [omikronlab@yandex.ru](mailto:omikronlab@yandex.ru)

Проведен сравнительный анализ ультраструктуры некоторых органелл при разных методах контрастирования ультратонких срезов на примере внутриклеточных паразитов — микроспоридий. Выявлены отличительные особенности, а также обоснованы преимущества и недостатки традиционного метода контрастирования уранил-ацетатом (УА) и нетрадиционного — экстрактом черного китайского чая (ОТЕ).

Ключевые слова: контрастирование ультратонких срезов, микроспоридии, ОТЕ, просвечивающая электронная микроскопия, ультраструктура, уранил-ацетат.

Принятые сокращения: УА — уранил-ацетат, ШЭР — шероховатый эндоплазматический ретикулум, ОТЕ — oolong tea extract (экстракт черного китайского чая).

Самым распространенным методом контрастирования ультратонких срезов биологических препаратов для просвечивающей электронной микроскопии до сих пор остается метод двойного окрашивания уранил-ацетатом (УА) и цитратом свинца по Рейнольдсу (Reynolds, 1963). Данный метод контрастирования используется для растительных и животных объектов, в том числе, и для облигатных внутриклеточных спорообразующих паразитов — микроспоридий (Microsporidia: Protozoa) (Larsson, 1994; Симакова и др., 2003, 2005; Refardt et al., 2008; Simakova et al., 2008).

Традиционный метод окрашивания имеет ряд недостатков. Так, УА является ядовитым радиоактивным веществом, кроме того, его необходимо хранить в темноте. Японские ученые (Sato et al., 2003) предложили альтернативный метод контрастирования — экстрактом черного китайского чая (oolong tea extract — ОТЕ) вместо УА на примере соединительной ткани. Затем данный метод был опробован ими на клетках печени самцов крыс (Sato et al., 2008). Было показано, что метод ОТЕ-контрастирования дает более низкий контраст гепатоцитов, хуже прокрашиваются мембранные структуры, однако лучше контрастируются гранулы гликогена и коллагеновые фибриллы. Все внутриклеточные органеллы, включая ядро, аппарат Гольджи, шероховатый эндоплазматический ретикулум (ШЭР) и митохондрии, было ясно видимы, и качество было таким же, как и при традиционном окрашивании. В результате было предложено рекомендовать метод ОТЕ-контрастирования для замены традиционного метода УА-контрастирования (Sato et al., 2008).

Задачами настоящего исследования являются сравнительный анализ ультраструктуры некоторых органелл при разных методах контрастирования ультратонких срезов (УА и ОТЕ) на примере микроспоридий, оценка преимуществ и недостатков традиционного метода контра-

стирования (УА) и нетрадиционного (ОТЕ), а также обоснование возможности использования нетрадиционного метода для окраски ультратонких срезов биологических тканей.

### Материал и методика

В качестве объекта исследований нами были выбраны внутриклеточные паразиты жирового тела личинок кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) — микроспоридии сем. Amblyosporidae. Зараженные личинки были собраны во временных и постоянных водоемах окр. с. Тегульдэт Томской обл. (Западная Сибирь, Россия).

Для электронной микроскопии ткани жирового тела зараженных личинок комаров фиксировали 2.5–24 ч при 4 °С 2.5%-ным глутаральдегидом на 0.1 М какодильном буферном растворе (pH 7.4). Затем промывали 0.2 М какодильным буферным раствором (pH 7.4) в течение 15 мин при комнатной температуре дважды. Личинок постфиксировали в 1%-ном OsO<sub>4</sub> в 0.1 М какодильном буферном растворе (pH 7.4) в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывки дистиллированной водой дважды по 15 мин их обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и абсолютном ацетоне и заключали в Эпон—Аралдит (Undeen, Vavra, 1997).

Ультратонкие срезы толщиной 60–100 нм готовили на ультратоме Ultratome III (LKB, Швеция). Необходимо отметить, что исследовали ультратонкие срезы, полученные с одних и тех же блоков.

Срезы контрастировали двумя методами. 1. Объектные сеточки со срезами помещали на каплю 2%-ного раствора УА на 50%-ном этаноле на 10–15 мин, затем ополаскивали в 50%-ном этаноле и промывали дистиллированной водой. 2. Объектные сеточки со срезами поме-

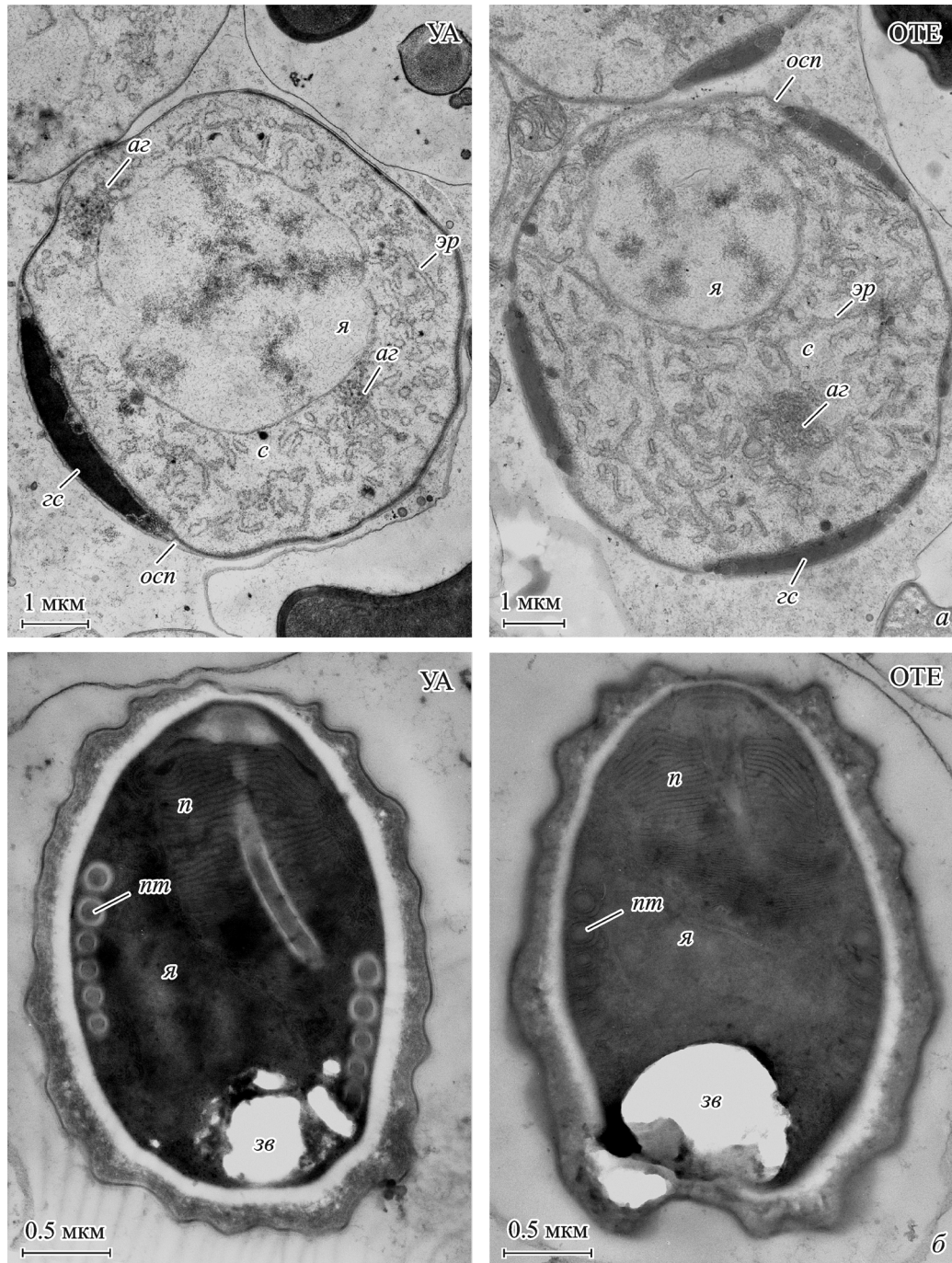


Рис. 1. Ультраструктура стадий развития и зрелых спор *Andreanna caspii* при контрастировании ультратонких срезов двумя методами — уранил-ацетатом (YA) или экстрактом черного китайского чая (ОТЕ).

а — ранняя спорогония, б — зрелые споры. аг — аппарат Гольджи, гс — гранулы секрета, зв — задняя вакуоль, осп — оболочка спорофорного пузырька, п — полярный пласт, пт — полярная трубка, с — ранний споронт, эр — эндоплазматический ретикулум, я — ядро.

щали в каплю 0.05%-ного раствора ОТЕ на 0.1 М какодильном буферном растворе (рН 7.4) на 35—45 мин, затем переносили на 10 мин в каплю того же буферного раствора, затем на 10 мин в каплю дистиллированной воды, после чего промывали дистиллированной водой. Раствор ОТЕ готовили не позднее чем за 3 ч до использования.

После YA- или ОТЕ-контрастирования препараты окрашивали 5—10 мин при комнатной температуре цитратом свинца (по: Reynolds, 1963). Полученные препараты просматривали в электронном микроскопе JEM-100 CXII (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Использованные реактивы: глутар альдегид, OsO<sub>4</sub>, Арадит 502, Эпон 812, DDSA, DMP-30; цитрат свинца (Fluka, Швейцария); какодильнат натрия; уранил-ацетат (Merck, Германия); ОТЕ (Suntory, Осака, Япония).

### Результаты и обсуждение

Нами проведен сравнительный анализ ультраструктуры некоторых органелл при разных методах контрастирования ультратонких срезов (традиционным — YA и не-



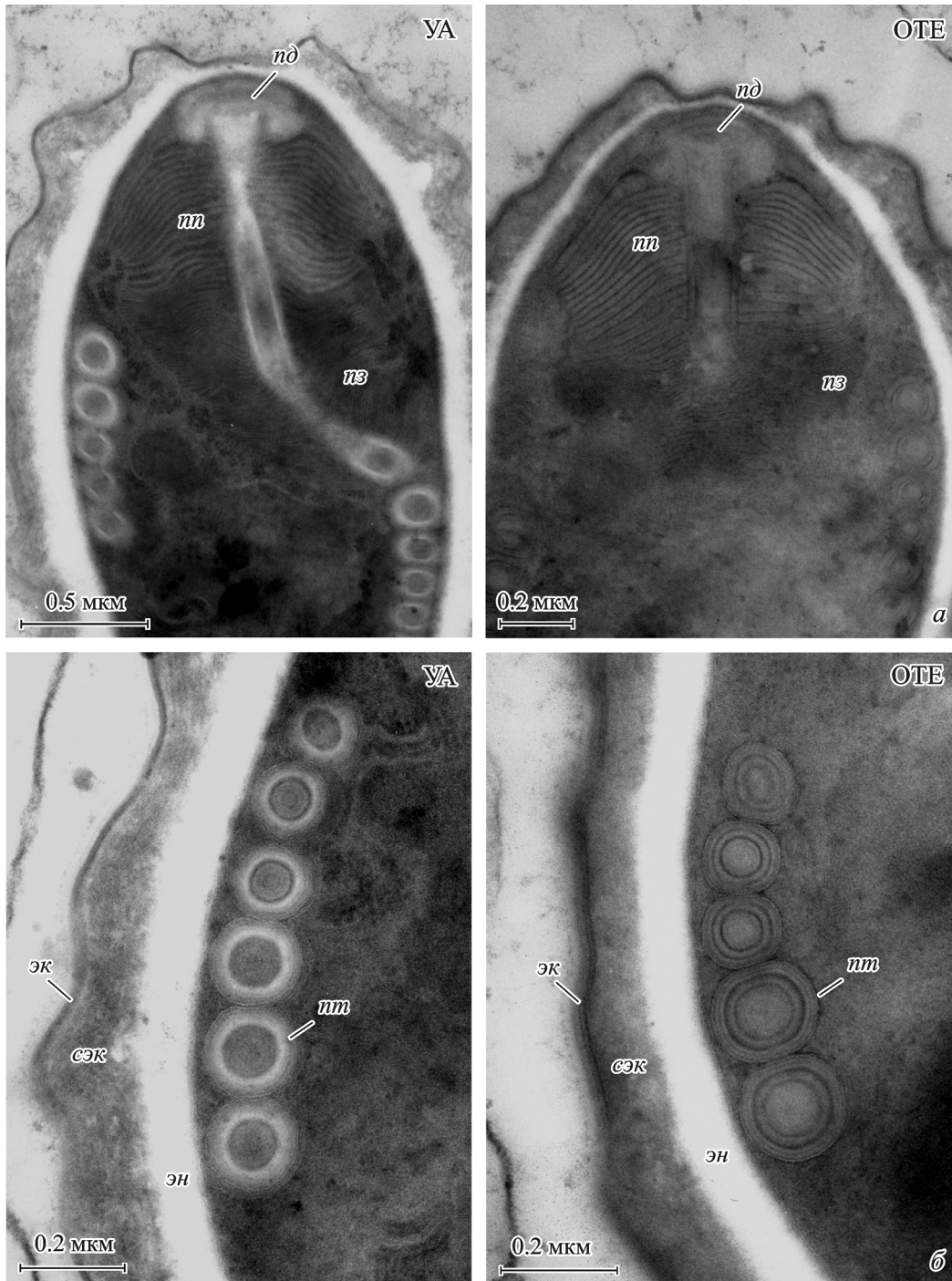


Рис. 2. Ультраструктура фрагментов зрелых спор *Andreeanna caspii* при контрастировании ультратонких срезов двумя методами — уранил-ацетатом (YA) или экстрактом черного китайского чая (ОТЕ).

*a* — передний полюс споры с полярным якорным диском и поляропластом; *б* — оболочка и полярная трубка зрелых спор. *pd* — полярный якорный диск, *pp* — задняя часть поляропласта, *nm* — передняя часть поляропласта, *nm* — полярная трубка, *сэк* — субэкзоспора, *эк* — экзоспора, *эн* — эндоспора.

традиционным — ОТЕ) на примере стадий развития и зрелых спор внутриклеточных паразитов — микроспоридий. Для исследований были использованы паразиты *Andreeanna caspii* Simakova et al., 2008 из комаров *Ochlerotatus caspius* (Pallas, 1771) и *Parathelohania tomski* Simakova, Pankova, 2004 из *Anopheles messeae* Fall., 1926.

Стадии развития данных паразитов имеют очень простое строение, в то время как споры микроспоридий устроены крайне сложно. Они окружены толстой трех-

слойной оболочкой (экзо-, эндоспора и плазматическая мембрана) и содержат ядро и аппарат экструзии, необходимый для заражения клетки хозяина. Строение спор является важным систематическим признаком при идентификации микроспоридий (Sprague et al., 1992; Canning, Vavra, 2000; Воронин, 2001). Мы выбрали данные объекты для сравнения разных методов контрастирования ультратонких срезов биологических объектов, в связи с тем что споры имеют сложную многослойную организацию обо-

лочки и внутриспоровых органелл (полярный якорный диск, полярoplast, полярную трубку и заднюю вакуоль).

При сравнении ультраструктуры стадий развития *A. caspii* характерных различий обнаружено не было (рис. 1, а). При ОТЕ-контрастировании прокрашивались все органеллы: оболочка спорофорного пузырька мембранного строения; эписпориальное пространство, заполненное секретом различной структуры (электронно-плотные гранулированные включения и округлые гранулы умеренных электронных плотностей); ядра споронтов, содержащие скопления хроматина; аппарат Гольджи; хорошо развитая сеть ШЭР; вакуоли, содержащие вкрапления секрета. Однако в общем отмечен более низкий контраст при ОТЕ-контрастировании стадий спорогонии. Традиционное УА-контрастирование более четко выявляло мембранные структуры, строение ШЭР, аппарата Гольджи и ядерного хроматина.

Изучение ультраструктуры зрелых спор показало, что ОТЕ-контрастирование также дает более низкий контраст (рис. 1, б). Этот метод окрашивания выявляет «мохнатый» наружный слой экзоспоры, но умеренно электронно-плотная субэкзоспора выглядит однородной, в то время как при УА-контрастировании четко видна ее слоистая структура (рис. 2, б). Полярный якорный диск и полярoplast при разных методах контрастирования не различаются. В обоих случаях полярoplast двухчастный (пластинчатый, плотнопластинчатый), каждая пластина окружена собственной мембраной (рис. 2, а).

Наибольший интерес представляет слабоанизофильная полярная трубка. Так, при традиционном окрашивании полярная трубка на поперечном срезе имеет 5—6 слоев: наружный слой тонкий электронно-прозрачный, окружен собственной мембраной, 2 слоя умеренной электронной плотности одинаковой толщины, электронно-прозрачный слой, электронно-плотный слой (отсутствует у толстых витков) и сердцевина умеренной электронной плотности (рис. 2, б).

ОТЕ-контрастирование выявляет 8 слоев полярной трубки: наружный слой тонкий электронно-плотный, окружен собственной мембраной, тонкий слой умеренной электронной плотности, 2 слоя умеренной электронной плотности одинаковой толщины, электронно-плотный слой, толстый слой умеренной электронной плотности, тонкий электронно-плотный слой, сердцевина умеренной электронной плотности, немного светлее, чем при УА-контрастировании (рис. 2, б). Очевидно, что УА-окрашивание выявляет дополнительные слои полярной трубки, между которыми наблюдаются более четкие границы. Кроме того, электронные плотности некоторых слоев на поперечном срезе полярной трубки при ОТЕ- и УА-контрастировании различаются.

Таким образом, несмотря на сниженный контраст, метод окрашивания ОТЕ позволяет выявить дополнительные структуры зрелых спор рода *Andreanna* Simakova et al., 2008. Все основные структуры стадий развития и спор прокрашиваются и выявляются отчетливо.

Нами также проведен сравнительный анализ двух методов окрашивания рода *Parathelohania* Codreanu, 1966 — паразитов малярийных комаров.

При сравнении ультраструктуры стадий развития *P. tomski* не обнаружено четких морфологических различий (рис. 3, а). При ОТЕ-контрастировании также достаточно четко прокрашивались все клеточные органеллы паразита. Нами были зарегистрированы некоторые незначительные различия. Как и в предыдущем случае, отме-

чался более низкий контраст при нетрадиционном контрастировании стадий спорогонии. Различия видны и в контрастировании секрета спорофорного пузырька (гранулярные включения), который представляет собой либо свободно лежащий в полости пузырька зернистый секрет (трубочки маленького диаметра), либо крупные осмиофильные глыбки, иногда напоминающие «ежики». На ультратонких срезах, окрашенных нетрадиционным методом, выявляется больше свободнолежащего зернистого секрета, и кажется, что полость пузырька более плотно им заполнена.

Изучение зрелых спор показало, что ОТЕ также дает более низкий контраст (рис. 3, б). Полярный якорный диск и полярoplast не различаются при разных методах окрашивания. В обоих случаях полярoplast двухчастный (рыхлопластинчатый, плотнопластинчатый), каждая пластина окружена собственной мембраной (рис. 4, а).

Различия наблюдались в контрастировании оболочки спор и анизофильной полярной трубки (рис. 4, б). При ОТЕ-контрастировании оболочка зрелых спор состоит из двухслойной экзоспоры (наружный слой электронно-прозрачный, внутренний электронно-плотный), субэкзоспоры умеренной электронной плотности, электронно-прозрачной эндоспоры и плазматической мембраны, в то время как при традиционном методе контрастирования субэкзоспора состоит из двух слоев (умеренной электронной плотности и электронно-плотного), которые неразличимы при окрашивании ОТЕ.

При сравнении контрастирования слоев поперечного среза полярной трубки выявлено следующее. При использовании традиционного метода окрашивания толстых витков полярная трубка на поперечном срезе имеет 5 слоев: наружный слой тонкий электронно-прозрачный, окружен собственной мембраной, электронно-плотный слой, 2 слоя умеренной электронной плотности (внутренний немного светлее наружного) и сердцевина умеренной электронной плотности (рис. 4, б).

На поперечном срезе тонких витков также просматривается 5 слоев, однако они окрашиваются иначе: наружный слой тонкий электронно-прозрачный, окружен собственной мембраной, слой умеренной электронной плотности, электронно-плотный слой, слой умеренной электронной плотности и сердцевина умеренной электронной плотности (рис. 4, б).

ОТЕ-контрастирование выявляет 7 слоев толстых витков полярной трубки: наружный слой тонкий электронно-прозрачный, окружен собственной мембраной, слой умеренной электронной плотности, тонкий электронно-плотный слой, толстый слой умеренной электронной плотности, тонкий электронно-плотный слой, толстый слой умеренной электронной плотности и сердцевина умеренной электронной плотности, светлее, чем при УА-контрастировании. Тонкие витки данных спор при разных методах окрашивания выглядят одинаково, но при ОТЕ-контрастировании слои имеют более четкие границы раздела (рис. 4, б).

Таким образом, как и в предыдущем случае, нетрадиционный метод окрашивания выявляет дополнительные слои полярной трубки, и между ними наблюдаются более четкие границы. Как и в случае *Andreanna caspii*, электронные плотности некоторых слоев на поперечном срезе полярной трубки при ОТЕ- и УА-контрастировании различаются.

Таким образом, метод ОТЕ-контрастирования прокрашивает все основные внутриклеточные структуры



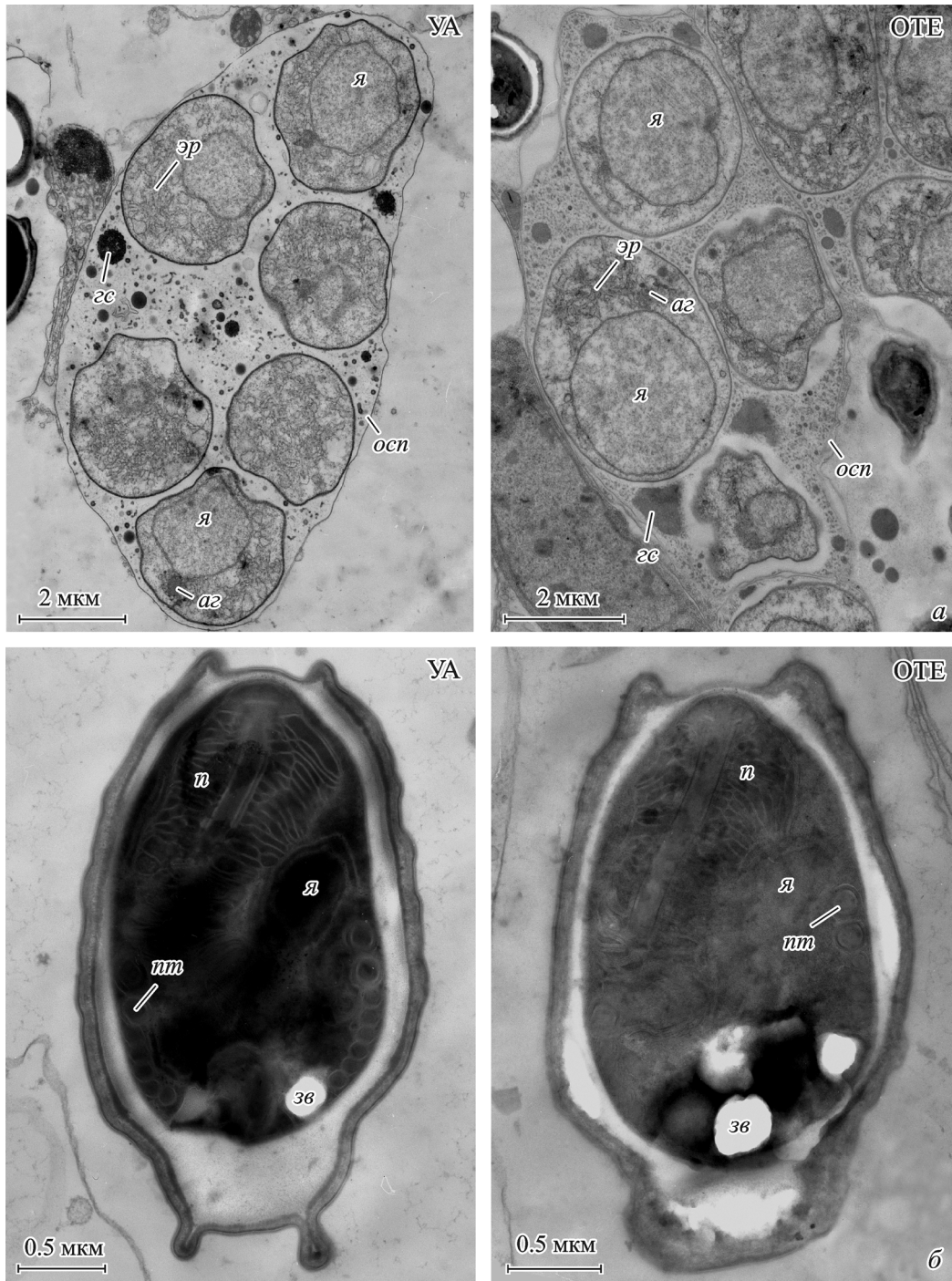


Рис. 3. Ультраструктура стадий развития и зрелых спор *Parathelohania tomski* при контрастировании ультратонких срезов уранил-ацетатом (УА) или экстрактом черного китайского чая (ОТЕ).

*а* — поздняя спорогония; *б* — зрелые споры. *аг* — аппарат Гольджи, *гс* — гранулы секрета, *зв* — задняя вакуоль, *осп* — оболочка спорофорного пузырька, *п* — полярный пласт, *пт* — полярная трубка, *эр* — эндоплазматический ретикулум, *я* — ядро.

микроспоридий, имеющие таксономическое значение, и, кроме того, позволяет выявлять дополнительные слои полярной трубки зрелых спор с более четкими границами между ними. Однако традиционное УА-контрастирование лучше выявляет мембранные структуры, слои оболочки зрелых спор, строение ШЭР, аппарата Гольджи и ядерного хроматина, а также дает более высокий общий контраст.

Следует отметить, что ОТЕ-контрастирование имеет ряд методических преимуществ и недостатков. Раствор ОТЕ безопасен в использовании и утилизации, в отличие от раствора УА он может долго храниться на свету при комнатной температуре, не теряя активности (в течение 4 мес не было замечено снижения красящей активности). Однако приготовление раствора занимает не менее 3 ч (экстракт чая медленно растворяется). Метод требует су-

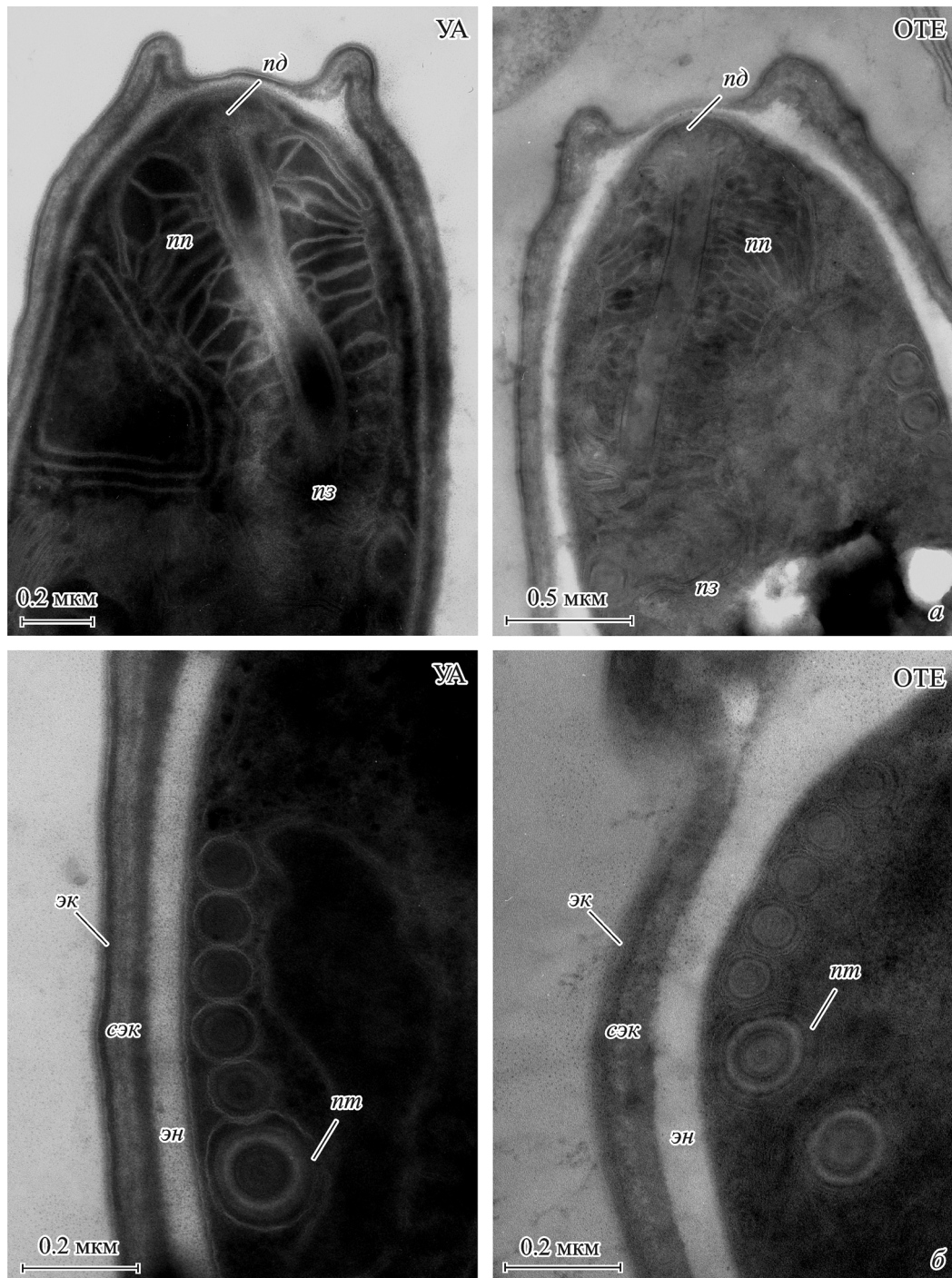


Рис. 4. Ультраструктура фрагментов зрелых спор *Parathelohania tomski* при контрастировании ультратонких срезов уранил-ацетатом (УА) или экстрактом черного китайского чая (ОТЕ).

*a* — передний полюс споры с полярным якорным диском и поляропластом; *б* — оболочка и полярная трубка зрелых спор. *nd* — полярный якорный диск, *ns* — задняя часть поляропласта, *nm* — передняя часть поляропласта, *nm* — полярная трубка, *сэк* — субэкзоспора, *эк* — экзоспора, *эн* — эндоспора.

ществено большего времени окрашивания и промывки препаратов. При увеличении времени окрашивания контраст изображения не повышался, но увеличивалась общая электронная плотность ультратонких срезов. Тем не менее метод ОТЕ-контрастирования может быть использован в качестве альтернативы традиционному контрастированию УА.

Авторы выражают благодарность д-ру M. Ghazizadeh (Central institute for Electron Microscopic Researches, Nippon Medical School, Токио, Япония) за любезно предоставленный экстракт черного китайского чая (ОТЕ).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-00468).



## Список литературы

- Воронин В. Н. 2001. О макросистеме типа Microsporidia Balbiani, 1882. Паразитология. 35 (1) : 35—44.
- Симакова А. В., Панкова Т. Ф., Иссу И. В. 2003. *Crepidula beklemishevi* gen. et sp. nov. и *Dimeiospora palustris* gen. et sp. nov. (Microsporida: Amblyosporidae) — новые микроспоридии из кровососущих комаров (Diptera: Culicidae) юга Западной Сибири. Паразитология. 37(2) : 145—153.
- Canning E. U., Vavra J. 2000. Phylum Microsporidia Balbiani, 1882. In: An illustrated guide for the Protozoa. 1: 39—126. Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, USA.
- Larsson R. J. I. 1994. *Trichoctosporea pygopellita* gen. et sp. nov. (Microsporida, Thelohaniidae), a microsporidian parasite of the mosquito *Aedes vexans* (Diptera, Culicidae). Archiv fur Protisten Kunde. 144 : 147—161.
- Larsson R. J. I. 2005. Fixation of microsporidian spores for electron microscopy. J. Invertebr. Pathol. 90 : 47—50.
- Refardt D., Decaestecker E., Johnson P. T., Vavra J. 2008. Morphology, molecular phylogeny, and ecology of *Binucleata daphniae* n. g., n. sp. (Fungi: Microsporidia), a parasite of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Crustacea: Branchiopoda). J. Eukaryot. Microbiol. 55 : 393—408.
- Reynolds E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17 : 208—212.
- Sato S., Aadachi A., Sasaki Y., Ghazizadeh M. 2008. Oolong tea extract as a substitute for uranyl acetate in staining of ultrathin sections. J. Microscopy. 229 : 17—20.
- Sato S., Sasaki Y., Adachi A., Dai W., Liu X.-L. 2003. Use of oolong tea extract (OTE) for elastin staining and enhancement in ultrathin sections. Med. Electron Microsc. 36 : 179—182.
- Simakova A. V., Vossbrinck C. R., Andreadis T. G. 2008. Molecular and ultrastructural characterization of *Andreanna caspii* n. gen., n. sp. (Microsporida: Amblyosporidae), a parasite of *Ochlerotatus caspius* (Diptera: Culicidae). J. Invertebr. Pathol. 99: 302—311.
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I., 1992. Taxonomy of phylum Microsporida. Crit. Rev. Microbiol. 18 : 285—395.
- Undeen A. H., Vavra J. I. 1997. Research methods for entomopathogenic Protozoa. In: Lacey L. A. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Acad. Press. 117—151.

Поступила 10 II 2009

## USE OF THE OTE-STAINING METHOD FOR ULTRATHIN SECTIONS ON THE EXAMPLE OF MICROSPORIDIA (PROTOZOA: MICROSPORIDIA)

A. A. Miller, A. V. Simakova

Research Institute of Biology and Biophysics of Tomsk State University;  
e-mail: omikronlab@yandex.ru

A novel method for staining ultrathin sections and examining organelles of taxonomic importance in microsporidian parasites was evaluated using oolong tea extract (OTE) and compared with traditional staining with uranyl acetate (UA). All basic intracellular structures of taxonomic significance were effectively stained with the OTE-staining method and additional layers of the polar filament with more clear boundaries between them were revealed. However, greater resolution and higher general contrast of several structures including membranes, layers of the envelope of mature spores, the structure of rough endoplasmic reticulum, Golgi complex, and nuclear chromatin were achieved with traditional UA-staining. The OTE-staining method has the advantage of being safe and preparations can be stored in light at room temperature with no loss in staining properties. However, greater staining time is required. We conclude that the OTE-staining method may be used as an alternative to traditional staining with UA with successful results.