

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ

МИКРООРГАНИЗМЫ В ИСКУССТВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Ответственные редакторы
д-ра биол. наук *В. Г. Ковров, В. А. Кордюм*

(Отдельный оттиск)



НОВОСИБИРСК
ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
1985

А. Г. Маркелова, Ю. М. Шапигузов, М. Г. Владимирова,
В. Е. Семененко

ОПЫТ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПИРЕНОИДА КАК ГИГАНТСКОЙ КАРБОКСИСОМЫ

Функциональная роль пиреноида — специфического плотного тела белковой природы, свойственного хлоропластам водорослей, до настоящего времени остается неясной. Это определяется тем, что в отличие от истинных органелл препаративное выделение пиреноида представляет существенные трудности и биохимические исследования изолированных пиреноидов до настоящего времени ограничиваются лишь двумя-тремя работами, указывающими на наличие в матриксе пиреноида РБФ-карбоксилазы (РБФК) — одного из ключевых ферментов фотосинтеза.

Для выяснения природы пиреноида нами впервые был применен [1] высокочувствительный метод иммунофлуоресцентной метки (НИФ). Учитывая, что клеточные стенки растений существенно препятствуют проникновению крупных молекул иммуноглобулинов внутрь интактной клетки, были подобраны культуры водорослей, не имеющих оболочки: *Dunaliella salina* и мутантный штамм *Chlamydomonas reinhardii* CW-15 (рис. 1). В реакциях непрямой иммунофлуоресценции использовали моноспецифическую антисыворотку к РБФК хлореллы. Предварительно было показано [2—4] наличие общих антигенных детерминант у РБФК различных водорослей.

В результате на двух культурах зеленых одноклеточных водорослей с помощью специфического к РБФК иммунофлуоресцентного зонда и системы 10 контролей показано яркое специфическое свечение интактного пиреноида, что свидетельствует о локализации в пиреноиде значительного количества РБФ-карбоксилазы [1, 5]. По аналогии с полиэдральными телами прокариотов (бактерии и синезеленые водоросли) [6, 7] пиреноид эукариотических организмов можно, таким образом, рассматривать как гигантскую карбоксисому.

Количественное измерение интенсивности специфического свечения пиреноида и свечения самой клетки в зависимости от физиологического состояния культуры и фазы развития клетки могло бы расширить наши представления о функциональной активности пиреноида как гигантской карбоксисомы.



Рис. 1. Иммунофлуоресценция пиреноидов в клетках *Dunaliella salina*.

Для того, чтобы оценить возможность таких количественных измерений, мы провели серию предварительных, носящих поисковый характер исследований.

1. Количественное измерение иммунофлуоресценции клеток, обработанных по методу НИФ.

2. Морфометрия (денситометрия) увеличенного фотоизображения иммунофлуоресценции клеток.

3. Сравнительная оценка количества РБФК в клетках и величины их пиреноида.

В настоящей работе использовались, как и ранее, культуры, не имеющие клеточной стенки: *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15, а также *Haematococcus pluvialis*.

Исследование ряда культур, имеющих клеточную стенку, показало, что после стандартной обработки препаратов 96%-ным этанолом клетки *Haematococcus pluvialis* становятся проницаемыми для молекул иммуноглобулинов, что и позволило использовать эту культуру в данной работе.

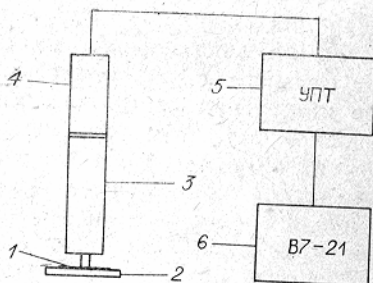
Методика приготовления и обработки препаратов водорослей для изучения локализации антигенов с помощью непрямой иммунофлуоресценции с использованием специфической к РБФК иммунной кроличьей и антикроличьей сыворотки, меченной флуоресцентном изотиоцианата натрия (ФИТЦ), описана ранее [1].

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК

Количественные измерения интенсивности флуоресценции микроскопических препаратов проводились на стандартном люминесцентном микроскопе МЛ-2 с помощью фото-

Рис. 2. Блок-схема установки для измерения интенсивности флуоресценции.

1 — препарат; 2 — предметный столик КС-2; 3 — люминесцентный микроскоп МЛ-2; 4, 5 — фотометрическая насадка ФМЭ-1; 6 — цифровой вольтметр В7-21.



метрической насадки ФМЭ-1, к которой для увеличения чувствительности вместо стрелочного микроамперметра дифференциально подключали цифровой универсальный вольтметр В7-21, позволяющий производить измерения токов в диапазоне от $1 \cdot 10^{-11}$ А (рис. 2). Для возбуждения флуоресценции использовались фильтры: С-С, ФС, СЗС при запирающем светофильтре «2», т. е. ЖС-18 и ЖС-19. В работе использовался объектив 90 с масляной иммерсией, позволяющий получать изображение клетки с диаметром пиреноида порядка диаметра измерительного зонда фотометрической насадки. С помощью интерференционного фильтра фотонасадки измерения проводили в желто-зеленой области спектра с максимумом пропускания при $\lambda = 552$ нм. При данном способе измерений диаметр зонда является лимитирующим фактором, ограничивающим точность определения пространственной локализации антигена в клетке. Результаты измерений приведены в табл. 1.

Как видно из таблицы, разница в свечении пиреноида и клетки в опытных вариантах очень велика — интенсивность свечения пиреноида выше примерно в 200 раз, тогда как в контроле они одинаковы. На основании количественных

Таблица 1

Характеристика распределения иммунофлуоресцентной метки в клетках *Dunaliella salina* и *Haematococcus pluvialis*, обработанных по методу НИФ

Препарат	Вариант опыта	Фототок (пА)		
		Фон	Клетка	Пиреноид
<i>Dunaliella salina</i>	Опыт, иммунная сыворотка	10,62 ± 4,04	49,57 ± 9,14	1352 ± 207
	Контроль, нейтральная сыворотка	48,3 ± 1,2	51,1 ± 1,0	51,17 ± 1,6
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Опыт, иммунная сыворотка	31,4 ± 1,5	80,33 ± 12,52	1265 ± 67
	Контроль, аутофлуоресценция	10,34 ± 9,86	26,02 ± 6,73	27,65 ± 9,68

измерений флуоресценции можно достоверно утверждать, что РБФК локализована именно в пиреноидах водорослей. Тем самым еще раз подтверждаются результаты, полученные нами при использовании непрямого цитоиммунофлуоресцентного метода для выявления локализации РБФК в клетках одноклеточных водорослей. С помощью указанной фотометрической насадки удалось провести лишь оценочные измерения соотношений интенсивностей специфической и неспецифической флуоресценции в клетке. Вместе с тем полученные результаты свидетельствуют о принципиальной возможности количественных оценок распределения антигенов в клетках с помощью фотометрических методов анализа. О детальном изучении распределения фермента в клетке, и в частности о его наличии в хлоропласте, можно будет говорить после измерений на более совершенных приборах.

МОРФОМЕТРИЯ (ДЕНСИТОМЕТРИЯ) УВЕЛИЧЕННОГО ФОТОИЗОБРАЖЕНИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КЛЕТОК, ОБРАБОТАННЫХ ПО МЕТОДУ НИФ

Кроме измерения интенсивности флуоресценции с помощью фотометрической насадки были проведены денситометрические измерения увеличенных изображений иммунофлуоресценции клеток, полученных при различных экспозициях и режимах проявления пластинок. Данный метод, хотя и уступает по чувствительности непосредственному измерению интенсивности флуоресценции, позволил выявить наличие закономерно сохраняющейся (независимо от режимов съемки и обработки фотоматериала), тонкой структуры специфической флуоресценции пиреноида.

На рис. 3 приведено схематическое изображение контура клеток дуналиелы и пиреноида и воспроизведена денситометрическая запись по разрезу клетки (см. рис. 3, линия А—А). Хорошо видно увеличение прозрачности препарата в области пиреноида (1), резкое уплотнение при переходе от пиреноида к клетке (2) и дополнительное увеличение плотности при переходе к фону препарата (3). В то же время в пограничной области пиреноид — клетка отмечается заметная зубчатость (4) линии, указывающая на существование переходных уровней флуоресценции. С методической точки зрения существенно, что характер зубчатости меняется в зависимости от направления линии разреза. Например, зубчатости почти нет в том случае, когда срез проходит через

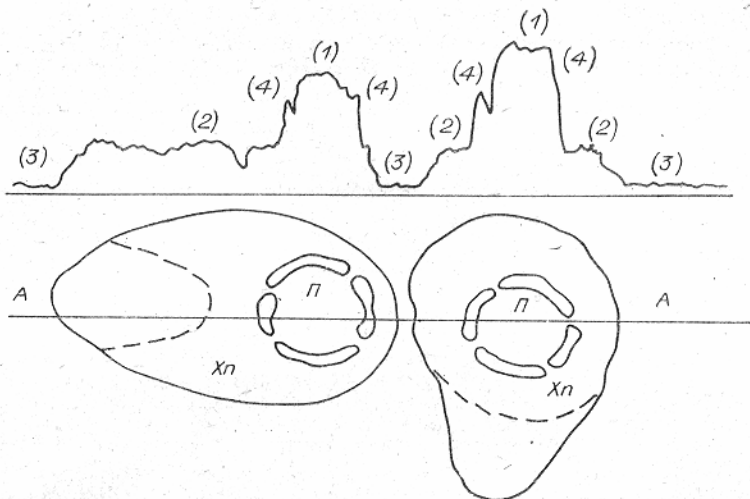


Рис. 3. Денситограмма позитивного изображения препарата клеток *Dunaliella salina*, обработанных по методу НИФ.

область пиреноида, расположенную у основания хлоропласта, и она четко проявляется в районе пиреноид — свободно лежащая система тилакоидов хлоропласта. Можно ожидать, что при более тонких методах учета проявятся иные физиологические закономерности в системе пиреноид — хлоропласт.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОЛИЧЕСТВА РБФК В КЛЕТКАХ И ВЕЛИЧИНЫ ПИРЕНОИДА

С целью выяснения того, как меняется количество РБФК в онтогенезе клеток водорослей, нами была получена синхронная культура мутанта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15. Одновременно с взятием проб для определения содержания РБФК готовились препараты для определения диаметров клеток и пиреноидов. Первое осуществлялось радиоизотопным методом. Приносим благодарность В. И. Шущанашвили за помощь в выполнении этой части работы.

Были исследованы три точки в световом периоде (8 ч) клеточного цикла. Как видно из табл. 2, наблюдается корреляция между содержанием РБФК, которое повышается по мере роста клетки, и увеличением размера пиреноида. Это указывает на то, что основная масса РБФК находится в пиреноиде, что подтверждает наши данные, полученные ме-

Таблица 2

Изменение количества РБФК, размеров клетки и пиреноида в синхронной культуре *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15

Параметр	Время на свету, ч		
	0	4	8
Количество РБФК, М СО ₂ /мин. ·кл. 10 ⁻⁶ , %	0,32	0,57	1,2
	100	178	375
Средний диаметр пиреноида, мкм	2,0	2,75	3,0
	100	137	150
Средний объем пиреноида, мкм	4,19	10,89	14,14
	100	260	337
Средний диаметр клетки, мкм	6,5	7,5	8,75

тодом непрямой иммунофлуоресценции, и согласуется с точкой зрения, что регуляция карбоксилирующей активности клетки идет на уровне изменения синтеза РБФК [8]. В то же время следует иметь в виду, что для отработки количественного определения содержания и распределения РБФК в интактных клетках с помощью цитоиммунофлуоресцентной метки нужно учитывать характер распределения иммуноглобулинов в теле пиреноида, явления гашения флуоресценции, геометрию пиреноида и др. [9, 10].

Проведенные исследования, как уже подчеркивалось, носят предварительный характер и пока не позволяют привести строгих количественных оценок распределения РБФК в клетке. Однако можно надеяться, что применение более совершенной аппаратуры позволит при использовании современных машинных методов математической обработки и анализа изображений микрообъектов производить сравнительные количественные оценки содержания и локализации антигена в клетке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова М. Г., Маркелова А. Г., Семенов В. Е. Выявление локализации рибулосибисфосфаткарбоксилазы в пиреноидах одноклеточных водорослей цитоиммунофлуоресцентным методом.— Физиология растений, 1982, т. 29, вып. 5, с. 941—950.
2. Kasatkina T. I., Vladimirova M. G., Pronina N. A. et al. A comparative immunochemical study of RDP-carboxylases in some prokaryotic phototrophs.— In: Microbial growth on C₁-compounds. Pushchino, 1977.
3. Владимирова М. Г., Маркелова А. Г., Касаткина Т. И. Свойства фотосинтетического аппарата, лишённого клеточной стенки му-

- тапта *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15.— Физиология растений, 1982, т. 29, вып. 1, с. 80—87.
4. Касаткина Т. И., Владимирова М. Г. Сравнительная иммунохимическая характеристика рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы зеленых и синезеленых водорослей.— В кн.: X Всесоюзное совещание по вопросам круговорота веществ в замкнутых системах. Киев: Наук. думка, 1983, с. 47—50.
 5. Владимирова М. Г., Маркелова А. Г., Касаткина Т. И., Семененко В. Е. Иммунофлуоресцентное выявление локализации рибулозодифосфаткарбоксилазы в пиреноидах клеток водорослей.— В кн.: Тезисы докладов Международного симпозиума: Регуляция метаболизма первичных продуктов фотосинтеза. Пуццино, 1983, с. 7—8.
 6. Beudeker R. F., Cannon G. S., Kuennon Y. C. e. a. Relation between D-Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, carboxysomes and CO₂ fixing capacity in the obligate chemolithotroph *Thiobacillus neapolitanus* grown under different limitations in the chemostat.— Arch. Microbiol., 1980, v. 124, N 2, p. 185.
 7. Codd G. A., Stewart W. D. F. Polyhedral bodies and Ribulose-1,5-diphosphate carboxylase of the blue-green alga *Anabaena cylindrica*.— Planta, 1976, v. 130, N 3. 323 p.
 8. Касаткина Т. И. Рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилаза микроводорослей и регуляция ее синтеза: Автореф. канд. дис.— М., 1978.— 34 с.
 9. Кошевой Ю. В., Лежнев Э. И., Макарова О. П. Прижизненная морфология клеток.— М.: Наука, 1977.— 128 с.
 10. Владимиров Ю. А. Фотохимия и люминесценция белков.— М.: Наука, 1965.— 232 с.

М. Г. Владимирова, Л. В. Саламатова,
Е. Д. Любимова, А. Г. Маркелова

ДЛИТЕЛЬНОЕ ХРАНЕНИЕ ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ В КОЛЛЕКЦИИ БЕЗ ПЕРИОДИЧЕСКИХ ПЕРЕСЕВОВ

Содержание коллекции водорослей, как и вообще коллекции любых культур, требует постоянного внимания. Нет однозначного ответа, как хранить водоросли, и вряд ли он возможен из-за разнообразия их генетических и физиолого-биохимических свойств. Исследователи периодически обращаются к этой проблеме, однако экспериментальные исследования в данной области требуют всестороннего подхода, они трудоемки и длительны. Видимо, поэтому публикаций, специально посвященных разработке способов хранения водорослей, довольно мало и они охватывают сравнительно небольшой объем материала.