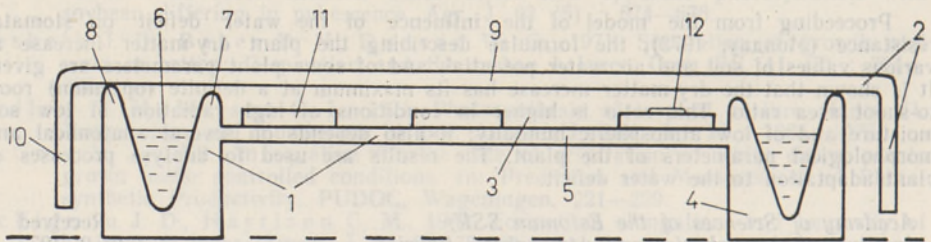


Elmar RÕIGAS

ALGLOOMADE ÜKSIKISENDITE ISOLEERIMINE JA  
KLOONIDE SAAMINEЭЛЬМАР РЫЙГАС. ИЗОЛИРОВАНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ОСОБЕЙ И ПОЛУЧЕНИЕ КЛОНОВ  
ПРОСТЕЙШИХELMAR ROIGAS. ISOLIERUNG DER EINZELWESEN UND HERSTELLUNG DER KLONEN  
DER PROTOZOA

Seni kirjeldatud meetodeil algloomade kloonide saamiseks on olulisi puudusi. Nii võib tahkes söötmes kultiveeritud üksikpesa (Samuels, 1962) areneda mitte ainult ühest, vaid mitmest juhuslikult lähestikku sattunud isendist. Ka mikromanipulaator (Фонбрюн, 1951) ei ole töökindlam, sest tema kapillaari imendub algloomade suspensioon silindrikujulise sambana, mille mikroskopeerimist häirib valguse tugev murdumine. Pealegi tuleb suspensioonisammast uurida laiuti ja sügavuti mitmes vaateväljas. Elavalt liikuvate algloomade korral on seetõttu väga raske öelda, kas mikromanipulaatori kapillaaris leidub ainult üks või mitu isendit.

Trihhomoonaste — konkreetselt *Trichomonas vaginalis*'e ja *T. hominis*'e — üksikisendite, seega ka kloonide usaldusväärse saamise tagamiseks konstrueerisime põhimõtteliselt uue ja kergesti käsitletava seadeldise ning töötasime välja originaalse meetodi.



1. Seadeldis. Mikroskoobi esemelauale paigutatav umbes Petri tassi suurune klaasist seadeldis (vt. joon.) koosneb alusest (1) ja kattest (2), millede vahele jääb kamber (3). Alus koosneb tugiplaadist (4) ja basaalsest horisontaalsest plaadist (5). Päärde- (7) ja välisvalli (8) vahel asetseb vagu (6). Kate koosneb horisontaalsest plaadist (9), mis äärel läheb üle vertikaalseks, servaga allapoole suunatud küljplaadiks (10) ja toetub ainult aluse välisvallile. Basaalsel horisontaalsel plaadil asetseb kuni 20...30 umbes 4...5-mm läbimõõduga ümmargust või ruudukujulist klaasplaadikest (11), millede paksus ei ületa 1,0...1,2 mm.

Seadeldise detailide vastastikused mõõtmed on valitud järgmiselt: a) kate ja piirdevalli harja vaheline pilu on väiksem kui klaasplaadikeste (11) paksus, et takistada plaadikeste sattumist vakku; b) aluse ja kate

vahel moodustunud kambri kõrgus on selline, et kambriisse mahub katet puudutamata klaasplaadike koos temal asuva, uuritavatest isenditest isotoonilise keedusoola lahuse abil valmistatud suspensiooni tilgakese (12); c) seadeldise need osad, mis suspensioonitilgakese mikroskoopilisel uurimisel jäävad valguskiirte teele, on plaadikujulised (alumine horisontaalne plaat, klaasplaadikesed ja katte horisontaalne plaat) ja mitte paksemad kui tavalised preparaadiklaasid.

2. Seadeldise ettevalmistamine ja töökorda seadmine. Akseeniliste kultuuride uurimiseks steriliseerisime paberisse pakitud seadeldise koos aluse keskosale paigutatud klaasplaadikestega vastavalt laboratoorse klaasmaterjali steriliseerimise tavalistele nõuetele. Vaheleht enne seadeldise kasutamist valasime vaku kambri vajaliku niiskuse saamiseks steriilset vett.

3. Uuritava materjali ettevalmistamine. Elavalt liikuvatest isenditest koosnevast kultuurist valmistasime isotoonilise keedusoolalahuse abil sellise suspensiooni, mille igas klaasplaadikesele viidud ca 1-mm läbimõõduga tilgakeses võis suspensiooni ideaalselt ühtlase disperseerumise korral sisalduda keskmiselt mitte rohkem kui üks isend. Sobivaks osutus sellise tihedusega suspensioon, mille igas milliliitris oli ca 15000 isendit. Trihmoonaste ühtlaseks jaotumiseks suspensioonis segasime seda hoolikalt, pidasime aga ühtlasi silmas, et seejuures ei kahjustuks isendite liikuvus ega reproduktsioonivõime. Järgnevalt viisime igale kambri asetsevale klaasplaadikesele Pasteuri pipeti abil ühe suspensioonitilgakese.

Kambriisse paigutasime umbes 15, maksimaalselt 20 klaasplaadikest ja järelikult ka sama palju tilgakesi. Lähtusime kaalutlusest, et suurema arvu tilgakeste korral võib nende mikroskopeerimine kesta liiga kaua ning kahjustada viimastena uuritavates tilgakestes trihmoonaste liikuvust. Liikuvus aga oli tingimata eluvõimelise isendi isoleerimisel peamiseks kriteeriumiks.

4. Mikroskopeerimine üksikisendi isoleerimiseks. Mikroskoobi МБИ-3 tavalisel binokulaarsel kasutamisel osutus sobivaks objektiiiv 10 $\times$ , okulaare võisime aga vabalt vahetada, sõltuvalt sellest, kui võrd täpselt tahtsime jälgida isoleeritavat isendit. Tavaliselt kasutasime okulaare 4 $\times$  või 5 $\times$ , minimaalse liikuvusega isendeid jälgisime vajaduse korral ka tugevamate okulaaridega.

Kuna uuritava materjali kiht oli õhuke ja asetes horisontaalsel tasapinnal, piisas objektiiiv 10 $\times$  ja okulaar 4 $\times$  kasutamisel enamasti ühekordsest fookustamisest ning vajadus reguleerida mikrokruvi abil oli minimaalne. Et sobiva suurusega suspensioonitilgake mahtus täielikult vaatevälja, langes enamasti ära ka vajadus seadeldise nihutamiseks horisontaaltasapinnas.

Eriti väärib rõhutamist see, et mikroskopeerimisel ei esinenud häirivaid optilisi moonutusi. Ainsa kõrvalnähtuna võis tilgakeste pikemaajalisel jälgimisel puhuti täheldada veeaurude kondenseerumist katte sisepinnale. Sel puhul piisas pinna pühkimisest steriilse marlitükikesega. Niiske kambri tingimused ja steriilsus võimalikult kiirel ja steriilsuse nõudeid järgival pühkimisel ei kannatanud.

5. Klooni kultiveerimine. Klaasplaadikesel, millel asetsevas tilgakeses olime hoolikalt mikroskoopilisel kontrollimisel kindlaks teinud ainult ühe isendi olemasolu, võtsime steriilse anatoomilise pintseti abil kambri välja ja suspendeerisime kohe koos tilgakese klooniga kultiveerimiseks sobivasse söötmesse. *T. vaginalis*'e üksikisendi inokuleerisime TV-1 söötmesse (Tepac, 1961), *T. hominis*'e klooniga kultiveerimiseks aga kasutasime TH-1 söödett (Teras, Tompel, 1968). Inkubeerimisel 37 °C

juures kulus makroskoopiliselt märgatava kasvu tekkimiseni tavaliselt 6...7, maksimaalselt 11...12 päeva. Ainult haruharva ei õnnestunud kloni saamine — nähtavasti seetõttu, et isoleeritud isend ei osutunud reproduktsioonivõimeliseks.

Kokku võttes võib öelda, et kõige määravamaks olid 1) võimalikult ühtlase ja sobiva tihedusega suspensiooni valmistamine ja 2) oskus asetada kapillaarse pipeti abil väikseid, ühtse suurusega tilgakesi klaasplaadikestele. Küllaldase vilumuse korral õnnestus jõuda nii kaugele, et 20 tilgakesest sisaldasid 4...5 ühe isendi. Meetodi usaldusväärsuse trihoomoonaste üksikisendite isoleerimisel tagas otsene ja optiliste häireteta kontroll mikroskoobi abil. On alust arvata, et kirjeldatud meetodi (autoritunnistus nr. 235917) ja seadeldise (autoritunnistus nr. 243148) abil on võimalik isoleerida ka teiste algloomade üksikindiviide ja saada nende kloone.

#### KIRJANDUS

- Ter as J., Tom pel H., 1968. *Trichomonas hominis* Davaine kultiveerimine ja puhaskultuuride saamine. EPA teadusl. tööde kogumik. Parasitoloogia-alased tööd. Tartu : 48—52.
- Sam uels R., 1962. Agar techniques for colonizing and cloning trichomonads. J. Protozoology 9 (1) : 103—107.
- Ter as Ю., 1961. О защитном действии сыворотки крови больных трихомониазом урогенитального тракта на белых мышей, внутривагинально инфицированных культурами *Trichomonas vaginalis*. Изв. АН ЭССР. Сер. биол. 10 (1) : 19—26.
- Фон б р ю н П., 1951. Методы микроманипуляции. (Перевод с франц.) М.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia  
Zooloogia ja Botaanika Instituut

Toimetusse saanud  
20. III 1974