

**Специализированный учебно-научный центр — факультет МГУ имени  
М. В. Ломоносова, школа имени А. Н. Колмогорова**

## **Курсовая работа**

**Адаптация метода сверхраспластывания ядер в профазе  
мейоза I для исследования клеток половой линии рептилий**

Выполнили ученики 11 класса:

**Никитин Павел Андреевич**

**Лосев Михаил Игоревич**

в лаб. цитогенетики

ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН

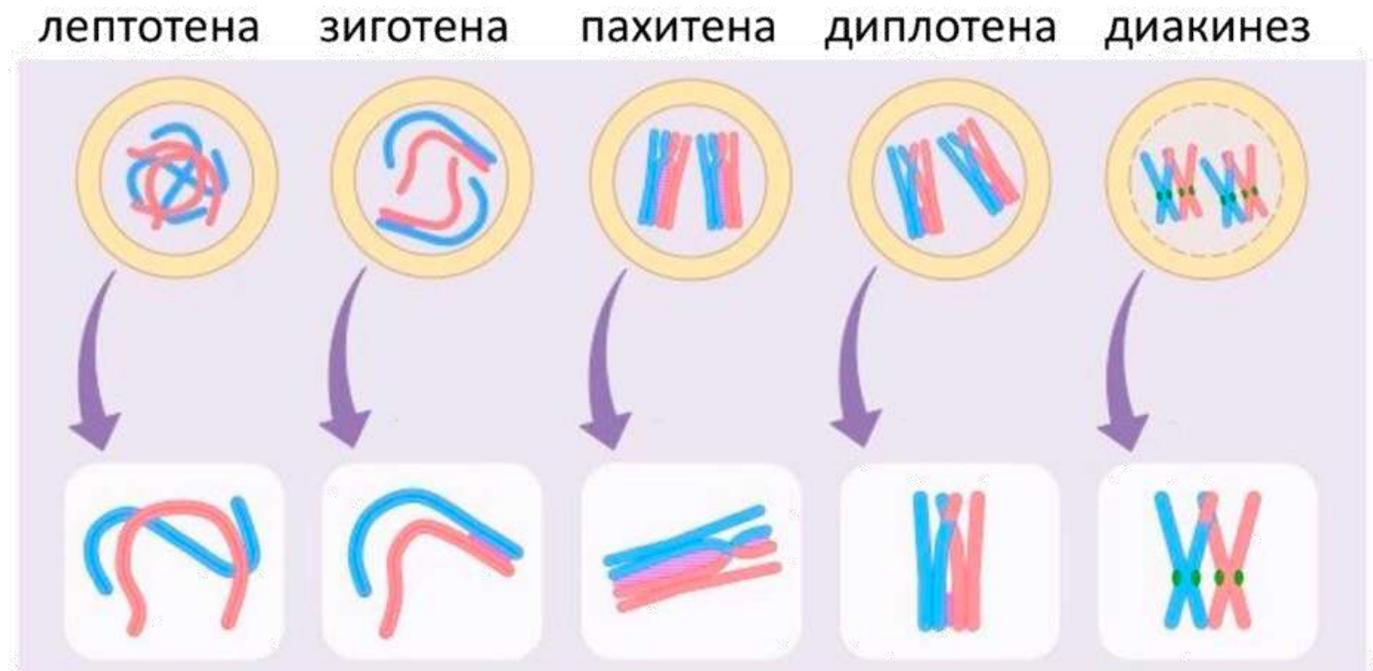
Научный руководитель:

к.б.н., н.с. Спангенберг В.Е.

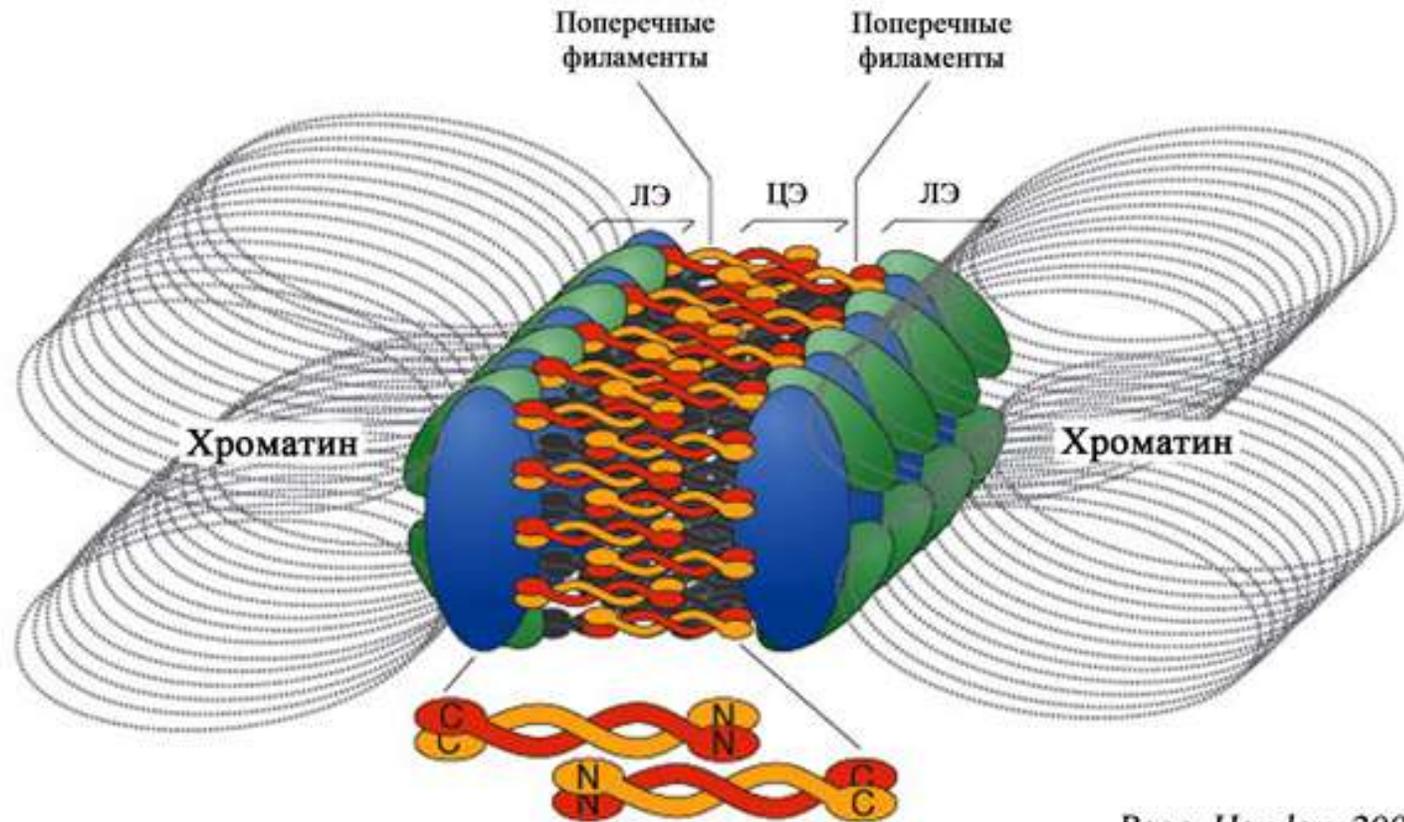


# Ключевые специфические события профазы I мейоза

- Стадии профазы I: лептотена, зиготена, пахитена, диплотена, диакинез.
- Формирование запрограммированных двуниевых разрывов ДНК (DSBs) и их репарация.
- Формирование специфического линейного скэффолда хромосом – осевого элемента, соединяющего – две сестринские хроматиды.
- Парное сближение и синапсис гомологов. Синапсис осуществляется посредством уникальной для этой стадии структуры мейотического бивалента - синаптонемным комплексом (СК).
- Кроссинговер и формирование хиазм, обеспечивающих связь гомологичных хромосом вплоть до анафазы I, что обеспечивает равноценное распределение генетического материала в ядрах сперматоцитов II порядка.



# Синаптонемный комплекс

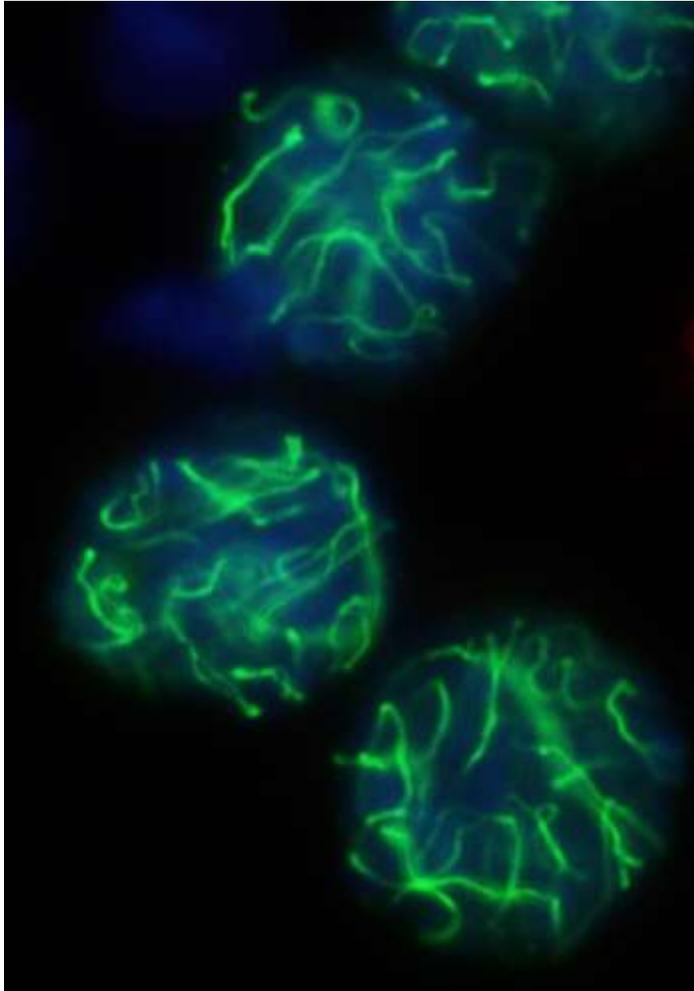


Модель строения синаптонемного комплекса (СК). Поперечный срез сегмента СК с латеральными элементами (ЛЭ), центральным элементом (ЦЭ), поперечными филаментами.

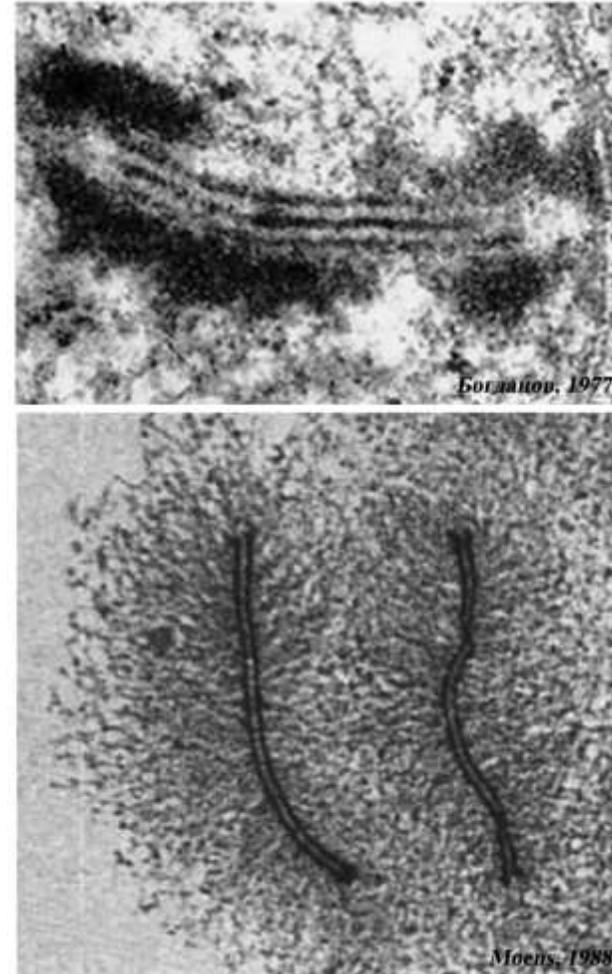
Схематично показаны петли хроматина от 4 хроматид в биваленте.

# Методы исследования хромосом в мейозе

Световая микроскопия



Электронная микроскопия



# Цели и задачи исследования

## Цель:

Разработать метод сверхраспластывания хромосом рептилий и исследовать белковые маркеры мейоза и центромер.

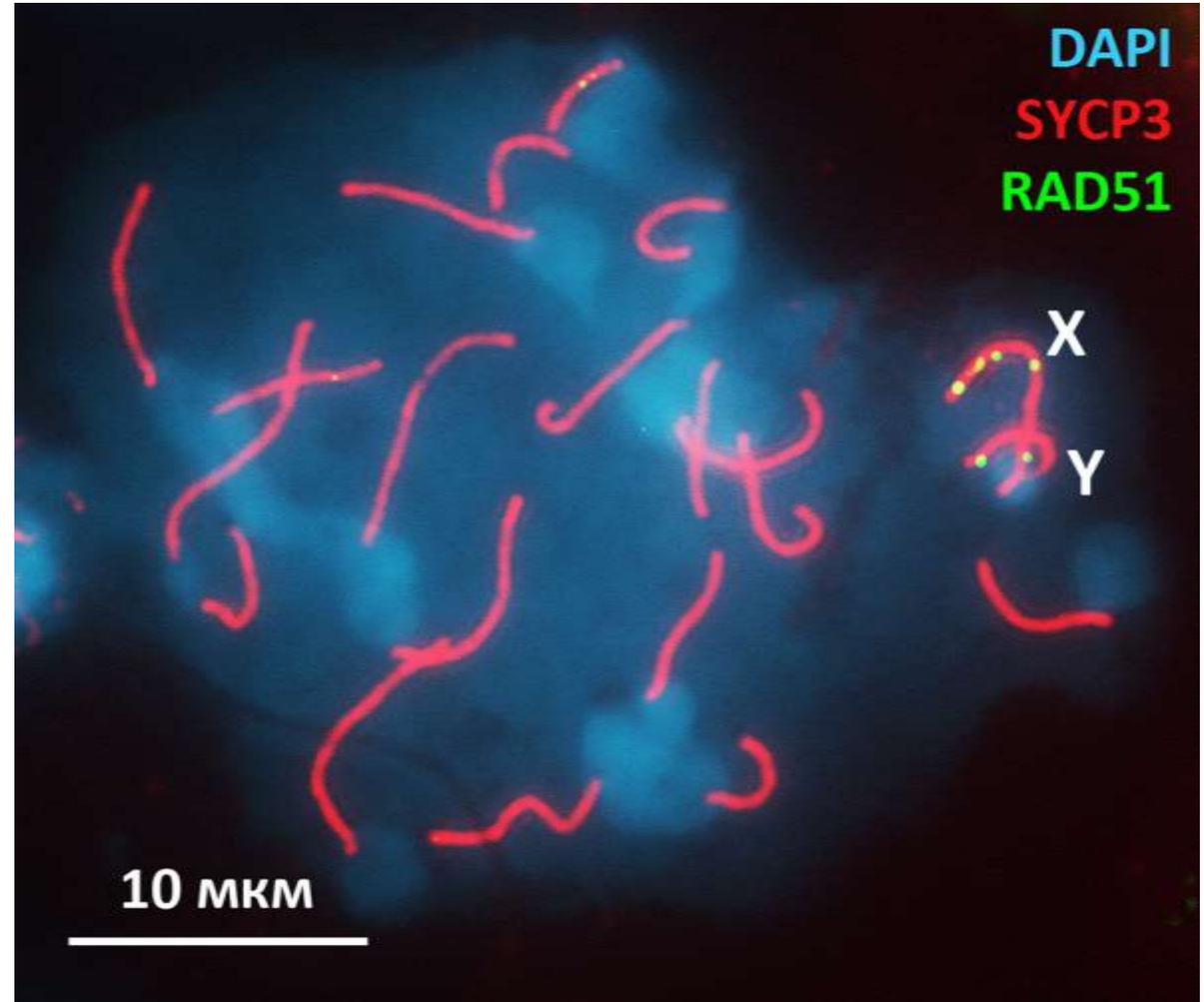
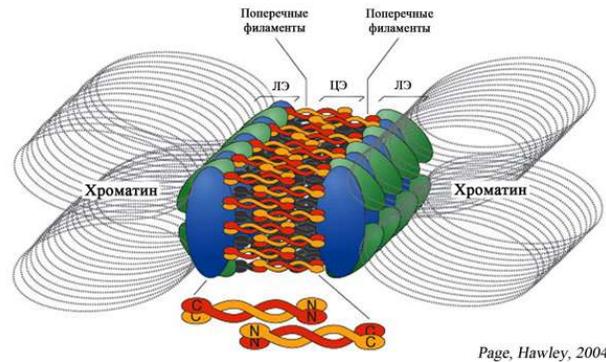
## Задачи:

1. Освоение метода распластывания ядер мейотических клеток.
2. Модификация метода для получения сверхраспластыванных хромосом.
3. Иммуноокрашивание мейоз-специфичных белков.
4. Проведение флуоресцентной *in situ* гибридизации с зондами к центромерам.
5. Совмещение изображений иммуноокрашивания и FISH.
6. Анализ полученных результатов.

# Материалы и методы

1. Получение распластанных препаратов ядер сперматоцитов (спредов) на поверхности гипотонического раствора методом Navarro et al. (1986) с собственными модификациями.
2. Непрямое иммуноокрашивание препаратов антителами к основным маркерным белкам профазы I мейоза.
3. ДНК-FISH с зондами к центромерам на распластанных препаратах сперматоцитов I порядка скальных ящериц.

# Стандартный препарат распластанного ядра сперматоцита I мыши Иммуноокрашивание осей хромосом и маркера репарации DSBs

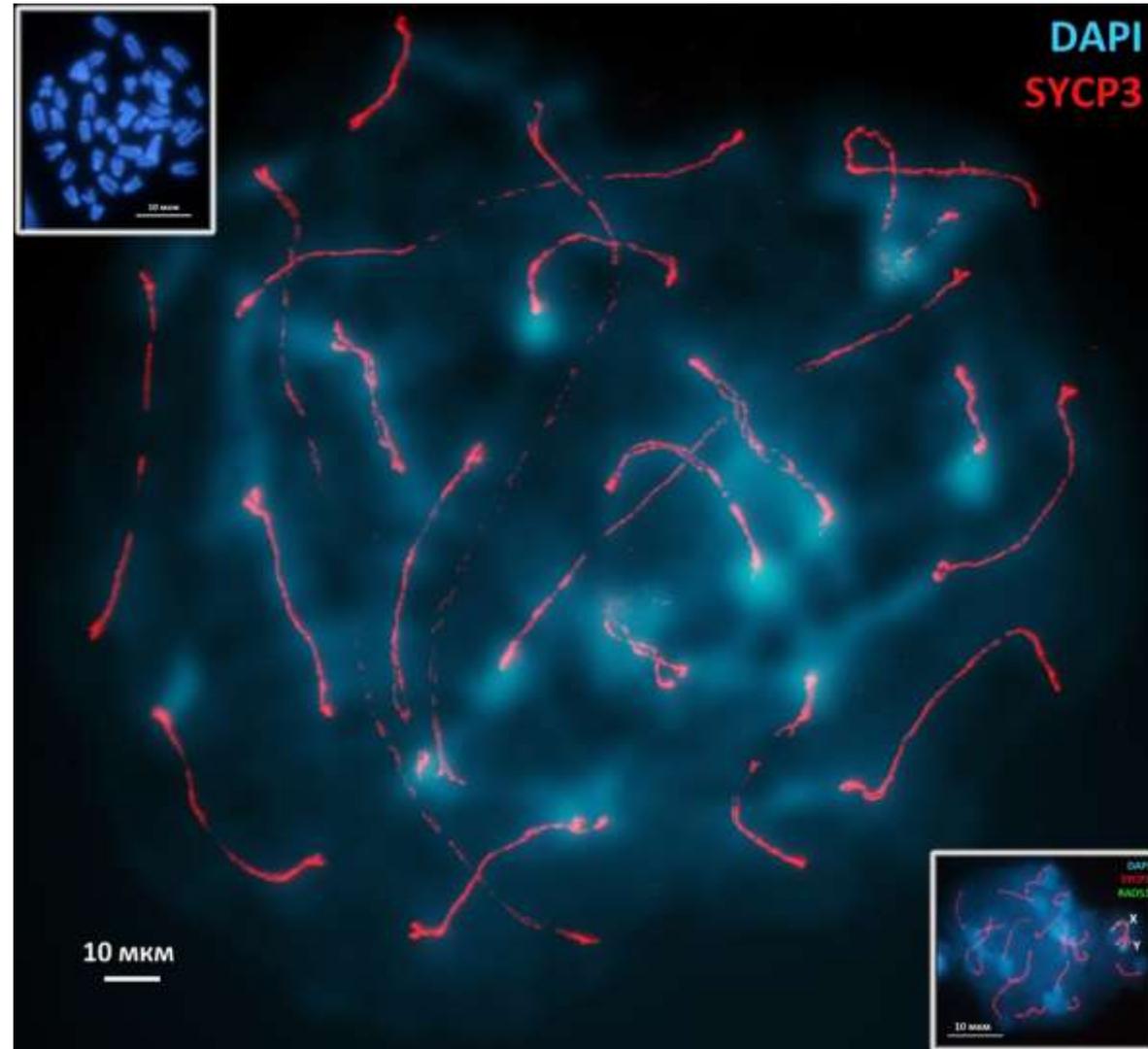


Хроматин окрашен красителем DAPI (синий цвет)

Осевые элементы синаптонемных комплексов – антителами SCP3 (красный)

Незавершенная репарация DSBs – антителами RAD51 (зеленый)

# Сверхраспластанное ядро сперматоцита I на стадии ранней диплотены



# Разработка метода сверхраспластывания ядер сперматоцитов I порядка

Модификации основных этапов стандартного метода распастывания ядер клеток:

1. Подбор раствора, с каплями которого сливаются капли суспензии клеток;
2. Манипуляции с процессом слияния капель гипотонического раствора и суспензии клеток.

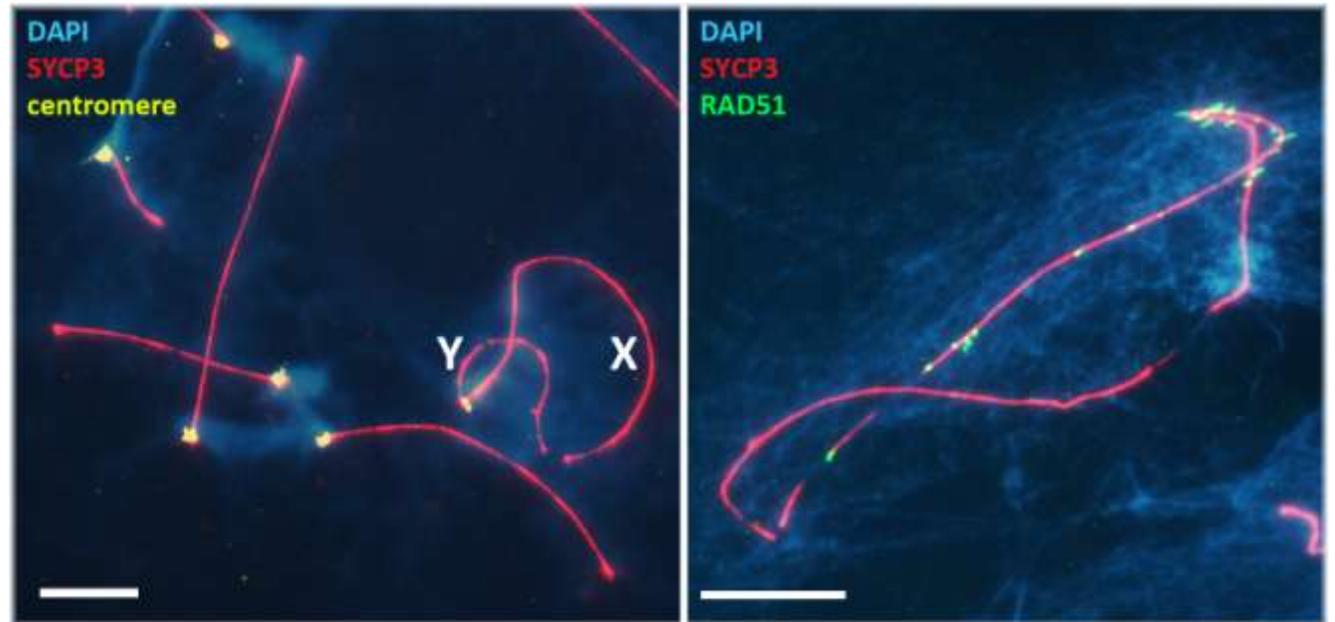
Оценка результатов проводилась после иммуноокрашивания препаратов антителами к белку осевых элементов хромосом в мейозе (SYCP3). Критериями оценки результата были: степень распастывания, фрагментация осей хромосом, сохранность архитектуры ядра и чистота препарата.



	Способ распастывания	Степень распастывания	Фрагментация осей хромосом	Сохранность архитектуры ядра	Чистота препарата
1	Наслаивание на капли 0.2М сахарозы	2	1	3	3
2	Наслаивание на капли 0.2М сахарозы с Tween 20	2	1	2	1
3	Наслаивание на дистиллированную воду	3	3	1	2
4	Слияние двух капель	2	1	3	3
5	Последовательное слияние капель	3	2	2	1
6	«Протягивание» суспензии между стеклами	3	2	2	3
7	Варианты 5 + 6	3	2	2	3

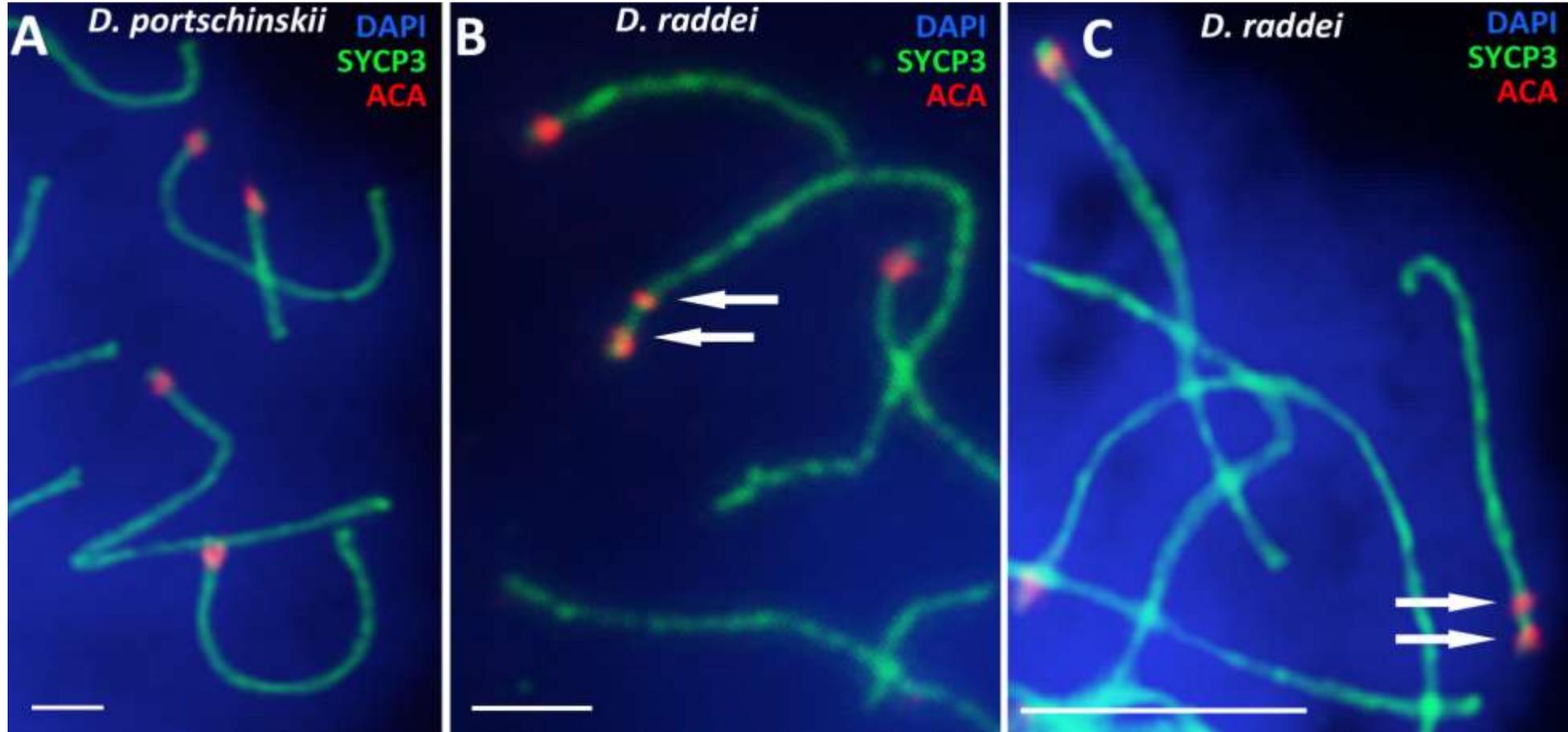
Выбраны оптимальные параметры метода сверхраспастывания хромосом

# Иммуноокрашивание сверхраспластанных хромосом



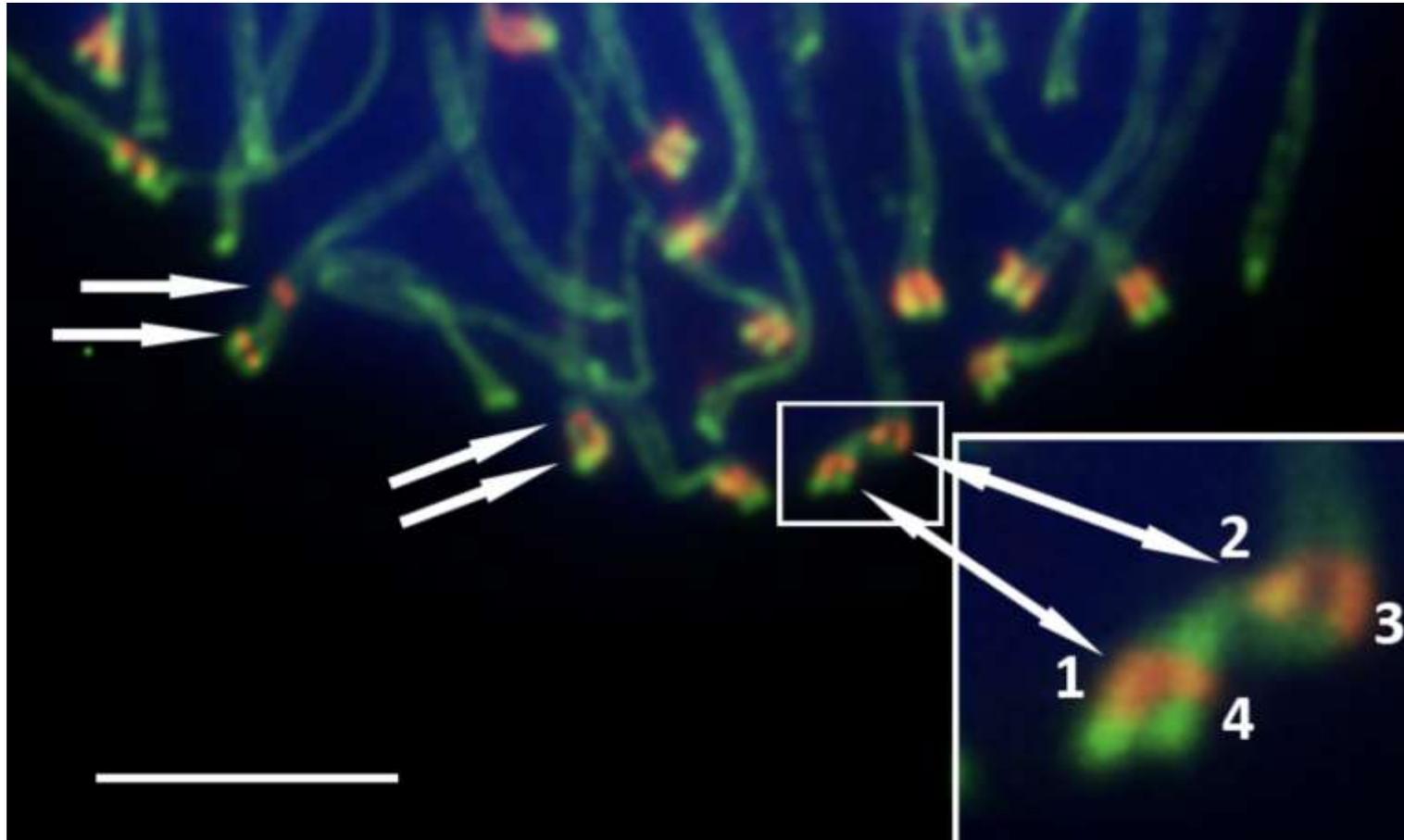
1. Хорошая детализация структуры хромосом
2. Применимость метода иммуноокрашивания

# Двойные центромеры скальных ящериц



Сравнения мейотических хромосом скальных ящериц *D. porschinskii* (A) и *D. raddei* (B и C) с указанием дицентрических хромосом у *D. raddei*. Иммуноокрашивание белка осевых структур мейотических хромосом SCP3 (зеленый), анти-центромерные антитела ACA (красный). Масштабный отрезок = 5 мкм.

# Двойные центромеры *D. raddei*



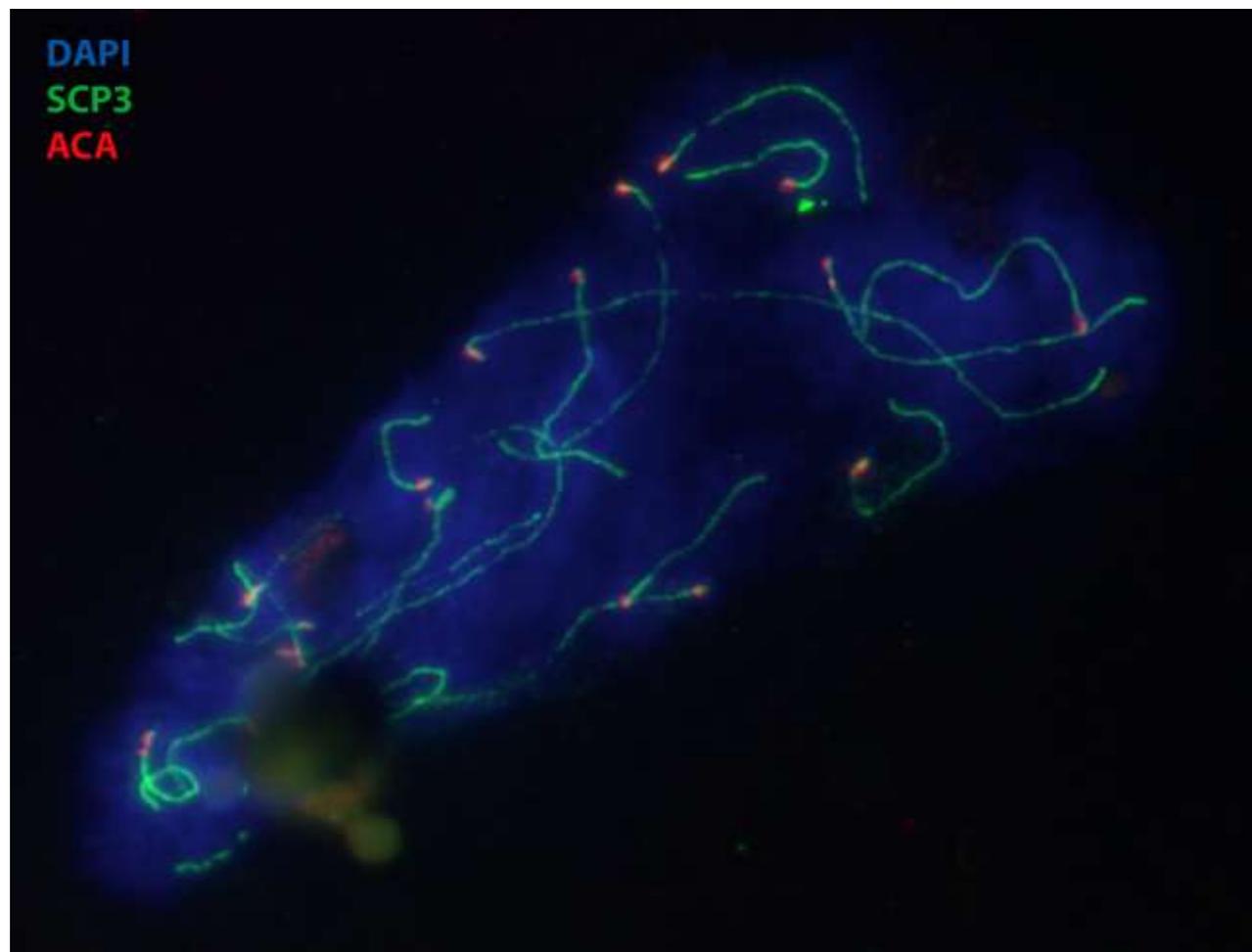
Препараты распластанных ядер сперматоцитов I у самца *D. raddei*. Стадия зиготены. Иммуноокрашивание центромер (красный сигнал). Стрелками обозначены двойные центромеры, которые в зиготене располагаются на обоих гомологах. Масштабный отрезок 5 мкм.

# Особенности работы со сперматоцитами ящериц



Сверхраспластанное ядро сперматоцита I самца *D. raddei*. Стадия поздней пахитены. Иммуноокрашивание центромер (красный сигнал). Стрелками обозначены двойные центромеры. Масштабный отрезок 5мкм.

# Решение проблемы



Сверхраспластанное ядро  
сперматоцита I самца *D. raddei*.  
Стадия поздней пахитены.  
Иммуноокрашивание  
центромер (красный сигнал).  
Масштабный отрезок 5мкм.

# Обсуждение

- Неоцентромеры могут образовываться в интактных хромосомах при осаждении молекулярных маркеров близ нативной центромеры
- Неоцентромеры могут быть унаследованы при инактивации одной из центромер
- *D. rostombekowi*, дочерний вид для *D. raddei*, является партеногенетическим. Есть небольшая вероятность, что не последнюю роль здесь играют двойные центромеры у родительского вида



*Darevskia raddei*

# Выводы

1. Разработан новый метод приготовления сверхраспластанных тотальных препаратов синаптонемных комплексов и адаптирован для изучения рептилий.
2. Доказана возможность использования методов иммуноокрашивания на сверхраспластанных препаратах синаптонемных комплексов.
3. С помощью разработанного метода сверхраспластывания были детально изучены синаптонемные комплексы скальной ящерицы *Darevskia raddei*, на некоторых хромосомах было подтверждено наличие двойных центромер: нативной и неоцентромеры.

# Благодарим за внимание!

