

Метод приготовления препаратов пахитенных хромосом видов с крупным геномом для иммунолокализации мейотических белков

Н.А. Кудрявцева^{1*}, А.С. Ермолаев¹, Л.И. Хрусталева^{1,2}

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550, Россия

² Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550, Россия

* natalia.kudryavtseva92@gmail.com

Цель: Современные методы молекулярной цитогенетики, такие как гибридизация *in situ* (ISH) и иммунолокализация, требуют препаратов хромосом с минимальным перекрытием для точного анализа. Однако мейотические хромосомы, которые в 7–40 раз длиннее митотических, создают сложности: их большие размеры приводят к образованию спутанных структур («клубков») на препаратах. Существующие протоколы приготовления хромосом, разработанные для видов с малыми геномами (например, *Arabidopsis arenosa* – 150 Mb, томат – 900 Mb), не применимы для растений с гигантскими геномами, таких как виды рода *Allium*. У лука-батуна (*Allium fistulosum*) геном достигает 16 000 Mb, а средняя длина синаптонемного комплекса (СК) на стадии пахитены составляет 90 мкм – в 5 раз больше, чем у томата (18 мкм). Эта разница в размерах объясняет, почему стандартные методы неэффективны для лука: длинные хромосомы с большей вероятностью дадут перекрытия в разбросах, что критично для ISH и иммунодетекции белков. Таким образом, виды с крупными геномами требуют разработки специализированных протоколов, учитывающих их уникальные цитогенетические особенности.

Материалы и методы: Разработка протокола приготовления высококачественных препаратов пахитенных хромосом для иммунолокализации проводилась на материнских клетках пыльцы (PMC) *A. fistulosum*. Был проведен сравнительный анализ влияния двух фиксирующих растворов (формальдегида и Кларка) на возможность получения хорошего распределения пахитенных хромосом. Для подтверждения того, что полученные препараты хромосом можно использовать для визуализации мейотических белков, была проведена иммунодетекция ZYP1. Протокол иммунодетекции мейотического белка был описан ранее [1]. Отдельные пахитенные хромосомы с ярким сигналом непрерывных треков ZYP1 были извлечены с помощью плагина Straighten в программном обеспечении ImageJ [2]. Длина SC отдельных хромосом была измерена с помощью программного обеспечения DRAWID [3].

Результаты: Мы разработали протокол, который позволяет получить высококачественные препараты пахитенных хромосом лука-батуна, пригодные для иммунодетекции мейотических белков. Хороший разброс хромосом был достигнут за счет использования фиксатора Кларка и 45% уксусной кислоты при раздавливании материнских клеток пыльцы (PMC). Мы успешно протестировали протокол на PMC *A. fistulosum* для визуализации белка ZYP1 (поперечные филаменты синаптонемного комплекса). На полученных препаратах мы смогли проследить каждую отдельную хромосому *A. fistulosum* от теломеры к теломере. Анализ результатов показал отсутствие значительного растяжения хромосом.

Выводы: В этом исследовании мы представляем протокол для получения хорошо распределенных пахитенных хромосом для видов, обладающих большими геномами и размерами хромосом. Высококачественные хорошо распределенные пахитенные хромосомы, полученные с помощью разработанного протокола, позволяют проследить отдельные хромосомы от теломеры до теломеры, что облегчает цитогенетическое исследование для видов с большими геномами.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ проекта № 24-76-10037.

Список литературы

- 1 Kudryavtseva N., Ermolaev A., Pivovarov A., Simanovsky S., Odintsov S., Khrustaleva L. The Control of the Crossover 230 Localization in Allium. *Int J Mol Sci.* 2023;24:7066
- 2 Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9:671-675
- 3 Kirov I., Khrustaleva L., Van Laere K., Soloviev A., Meeus S., Romanov D., Fesenko I. DRAWID: user-friendly java software 263 for chromosome measurements and idiogram drawing. *Comp Cytogenet.* 2017;11:747