

УДК 576.3

ЦИТОЛОГИЯ

А. Б. ИОРДАНСКИЙ, А. А. ПРОКОФЬЕВА-БЕЛЬГОВСКАЯ,
Н. С. БАДАЕВ, М. О. КОЛОСОВА, А. В. ЗЕЛЕНИН

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ УЧАСТКОВ В ГЕТЕРОХРОМАТИНЕ С ПОМОЩЬЮ САРКОЛИЗИНОАКРИДИНА

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 4 I 1971)

Изучение структурной дифференциации по длине хромосом и, в частности, локализация гетерохроматических районов уже давно привлекает внимание цитогенетиков (¹⁻⁷). Однако до последнего времени выявление гетерохроматина на хромосомах было сопряжено со значительными методическими трудностями, что в значительной степени ограничивало число объектов и препятствовало широкому развитию исследований. Именно поэтому значительный интерес вызвали сообщения возглавляемой Касперссоном группы (⁸⁻¹⁰) о возможности локализации гетерохроматических районов с помощью флуорохрома акрихин-иприта (АИ). При этом авторы исходили из предпосылки, что алкилирующая ипритная группа АИ обеспечивает преимущественное связывание этого вещества с участками ДНК хромосом, богатыми гуанином. Сравнение локализации и размеров интенсивно флуоресцирующих участков хромосом *Vicia faba* и *Trillium erectum*, окрашенных АИ с рисунком гетерохроматина, выявленного с помощью холода по Дарлингтону (^{1, 8}), наглядно показало, что у этих хорошо изученных объектов АИ действительно концентрируется только в районах структурного гетерохроматина.

Поскольку АИ не выпускается отечественной промышленностью и отсутствует в каталогах известных зарубежных фирм, возникла необходимость заменить его каким-либо отечественным препаратом, обладающим, как и он, алкилирующей ипритной группой и флуоресцирующим акридиновым кольцом. Таковым оказался сарколизиноакридин (СА), содержащий ядро акридина и азотистый иприт в *n*-N,N-бис-(2-хлорэтил)-аминофенилаланиновой группировке (¹⁰). С помощью СА мы сначала отработали методику выявления гетерохроматина на хромосомах *V. faba*, служивших тест-объектом, а потом изучили локализацию интенсивно флуоресцирующих дисков на политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*.

Материалом первой части исследования служили вторичные корешки *V. faba*, предварительно синхронизированные 5-аминоурацилом (¹²). Материал фиксировали спирт-уксусной смесью 3:1 3 час., а затем хранили на холоду в 70° спирте. Кончики корешков переносили в 45% уксусную кислоту и измельчали в ступке при комнатной температуре. Измельченный материал взвешивали в небольшом избытке уксусной кислоты и очищали от крупных фрагментов центрифугированием (1000 об/мин, 1 мин.). Полученную таким образом суспензию клеток использовали для приготовления давленных препаратов с помощью сухого льда. После удаления покровных стекол препараты помещали в 100° спирт, после чего делали проводку до буфера pH 4,1 (по Мак-Илвейну). Затем препараты помещали в раствор СА (15 мкг/мл) в том же буфере на 15 мин. После окраски препараты промывали в буфере и покрывали покровным стеклом.

Анализ препаратов проводили на микроскопе МЛ-2 с планахроматом К. Цейсс (Йена) 100×, А 1,25. Флуоресценцию возбуждали в синей области спектра (фильтры БС-8, СЗС и ФС-1); в качестве запирающего использовали фильтр ЖС-18 в комбинации с СЗС-19.

Исследование показало, что в результате обработки СА хромосомы и интерфазные ядра *V. faba* приобретают отчетливо различимую зеленую флуоресценцию. В хромосомах содержатся отдельные участки, имеющие ярко зеленое свечение, в то время как остальные части хромосом светятся тускло-зеленым. В интерфазных ядрах, имеющих в целом тускло-зеленую флуоресценцию, также отчетливо различаются отдельные участки с ярким свечением. Препараты устойчивы к действию возбуждающего света и не выцветают в течение 1,5—2 час. постоянного облучения в микроскопе.

Детальное исследование хромосом *V. faba* позволило установить, что участки интенсивной зеленой флуоресценции обнаруживаются при окраске СА в тех же местах (рис. 1), что и при окрашивании АИ. Нам не удалось обнаружить никаких различий в распределении и рисунке гетерохроматических районов по сравнению с опубликованными данными^(8, 9). Это дало основание полагать, что СА по своим химическим и флуоресцентным свойствам вполне пригоден для выявления гетерохроматических участков хромосом, и позволило перейти к изучению политенных хромосом слюнных желез *D. melanogaster*.

Слюнные железы выделяли в 0,6% растворе хлористого натрия, в течение 15 мин. фиксировали в спирт-уксусной смеси 3:1 и затем раздавливали в 45% уксусной кислоте. Покровные стекла снимали на сухом льду. Дальнейшие операции были такими же, как при приготовлении препаратов *V. faba*.

Исследование показало, что в политенных хромосомах *D. melanogaster*, окрашенных СА, высоко избирательной интенсивной флуоресценцией во всех ядрах обладают только три участка (рис. 2А, Б). По картам Бриджеса 1935 и 1938 гг.^(13, 14) они соответствуют дискам 81F — центромерный район правого плеча хромосомы III (рис. 2Д, Е), 101F — центромерный район хромосомы IV и 102D — в дистальной трети хромосомы IV (рис. 2А, Б, В, Г). Хромоцентральные гетерохроматические районы обоих плеч хромосомы II и левого плеча хромосомы III окрашиваются диффузно и в некоторых ядрах обладают слабой флуоресценцией. В некоторых ядрах в районе хромоцентра рядом с интенсивно флуоресцирующим диском 101 F обнаруживается сходная интенсивно флуоресцирующая структура (рис. 2А и Б), природа ее не установлена. Кроме указанных выше трех дисков, все остальные диски хромосом II, III, IV и X хромосомы приобретают в результате обработки СА тускло-зеленую флуоресценцию, интенсивность которой в основном коррелирована со степенью их окрашиваемости орсеином или по Фельгену, что обеспечивает возможность достоверной идентификации каждого диска (рис. 3).

Таким образом, результаты анализа дисков политенных хромосом *D. melanogaster* свидетельствуют о высокой специфичности распределения участков интенсивной флуоресценции, вызываемой СА в строго индивидуальных дисках.

Среди трех участков, обладающих интенсивной флуоресценцией — (81F, 101F и 102D), свойствами гетерохроматических районов (негомолочная конъюгация) обладают диски 81F и 101F (центромерные районы хромосом RIII и IV). Участок 102D расположен в эухроматическом районе хромосомы IV и представлен в нем четкими дисками. В то же время ни один из двадцати дисков проксимального гетерохроматического района X-хромосомы (район 20 ABCD), так же как ни один из 20 дисков интерстициальных гетерохроматических районов этой хромосомы (диски 1F, 2B, 3C4, 3C8, 4A, 4C3, 4E, 7A, 7B, 7C, 7F, 8C, 9B, 11A, 12D, 12EF, 15E, 16F, 17A, 19E), а также гетерохроматические районы дистального конца

X хромосомы и хромосомы IV (районы 1A и 102F), обладающие типичными свойствами гетерохроматических районов (¹⁵, ¹⁶), не обнаруживают интенсивной флуоресценции при обработке СА.

Если по аналогии с АИ и в соответствии с заключением Касперссона и Воза (⁸⁻¹⁰, ¹⁷) и полагать, что и СА преимущественно связывается с гетерохроматическими районами, то полученные данные свидетельствуют о том, что: 1) участок 102D представляет собой внутренний гетерохроматический район хромосомы IV и 2) проксимальные, дистальные и интерстициальные гетерохроматические районы политенных хромосом *D. melanogaster*, несмотря на ряд общих свойств и способность конъюгации между собой (¹⁵, ¹⁶), по своим тонким биохимическим особенностям высоко неоднородны, так как способность реагировать с азотистым ипритом СА обладают преимущественно только строго индивидуальные диски этих районов в двух хромосомах — RIII и IV. Однако не исключено также, что в политенных хромосомах *D. melanogaster* интенсивно флуоресцирующие диски представляют собой высоко специфичные структуры эухроматических, а не гетерохроматических районов (диск 102D).

В связи со сказанным большого внимания заслуживают результаты работы Воза (¹⁸), использовавшего для выявления гетерохроматина в политенных хромосомах *D. melanogaster* окраску их акрихином. Как было показано ранее (¹⁷), обработка акрихином и акрифлавином в концентрациях, в 750 раз больших, чем СА, позволяет, подобно АИ, выявлять гетерохроматин, хотя специфичность этой реакции, по-видимому, значительно ниже (⁶, ¹⁷) и окраска препаратов проводится в условиях, не позволяющих хорошо сохранить их структуру (¹³). Сопоставление участков хромосом, обладающих интенсивной флуоресценцией, при обработке СА и акрихином, обнаруживает дифференциацию их в отношении к этим препаратам (табл. 1): некоторые диски интенсивно флуоресцируют при окраши-

Т а б л и ц а 1

Дифференциальная интенсивная флуоресценция индивидуальных районов политенных хромосом *D. melanogaster* при окрашивании акрихином и сарколизиноакридином

Препараты	Районы хромосом					
	81F	101F	102B	102D	102F	20D
Акрихин *	+	+	+	—	+	+
Сарколизиноакридин	+	+	—	+	—	—

* По данным Воза (¹⁸).

вании обоими веществами (районы 81F и 101F), другие выявляют эту способность лишь при использовании акрихина (районы 20D, 102B и 102F), и, наконец, район 102D интенсивно флуоресцирует лишь при окраске СА. Природа этой дифференциальной и закономерной окрашиваемости двумя флуорохромами ограниченных участков хромосом требует дальнейшего исследования, в ходе которого может быть пролит определенный свет на цитохимическую и функциональную природу гетерохроматиновых участков хромосом. В то же время необходимо отметить, что флуоресцентномикроскопическое исследование с использованием СА уже в настоящее время может быть успешно использовано для идентификации некоторых участков в гетерохроматиновых районах хромосом различных видов растений и животных. Следует при этом обратить внимание на работу Касперссона и др. (¹⁹), в которой показано, что с помощью цитофлуорометрического исследования обработанных АИ препаратов удается достоверно

идентифицировать ранее не различимые хромосомы человека в группах 6—12, 13—14 и др.

Институт молекулярной биологии
Академии наук СССР

Поступило
28 XII 1970

Институт медицинской паразитологии и
тропической медицины
Москва

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ C. D. Darlington, L. F. La Cour, J. Genetics, **40**, 185 (1940). ² T. Hinton, Genetics, **27**, 119 (1942). ³ A. Hannah, Adv. Genetics, **4**, 87 (1951). ⁴ S. G. Smith, Chromosoma, **4**, 585 (1952). ⁵ M. Kurabayashi, Japan. J. Bot., **14**, 349 (1954). ⁶ K. Cooper, Chromosoma, **10**, 535 (1955). ⁷ A. Lima-de-Faria, H. Jaworska, Nature, **217**, 138 (1968). ⁸ T. Caspersson, S. Farber et al., Exp. Cell Res., **49**, 219 (1967). ⁹ T. Caspersson, L. Zech et al., Exp. Cell Res., **58**, 128 (1969). ¹⁰ T. Caspersson, L. Zech et al., Exp. Cell Res., **58**, 141 (1969). ¹¹ М. О. Колосова, Хим. гетероцикл. соед., № 6, 943 (1966). ¹² H. C. Smith, C. Fussel, B. Kugelman, Science, **142**, 595 (1963). ¹³ C. B. Bridges, J. Hered., **26**, 60 (1935). ¹⁴ C. B. Bridges, J. Hered., **29**, 11 (1938). ¹⁵ А. А. Прокофьева-Бельговская, Изв. АН СССР, сер. биол., **3**, 362 (1939). ¹⁶ B. P. Kaufmann, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., **25**, 571 (1939). ¹⁷ C. G. Vosa, Chromosoma, **31**, 446 (1970). ¹⁸ C. G. Vosa, Chromosoma, **30**, 366 (1970). ¹⁹ T. Caspersson, L. Zech et al., Chromosoma, **30**, 215 (1970).



Рис. 1. Гетерохроматические районы в хромосоме *M. vicia faba*



Рис. 3. Общая картина политенных хромосом *D. melanogaster*

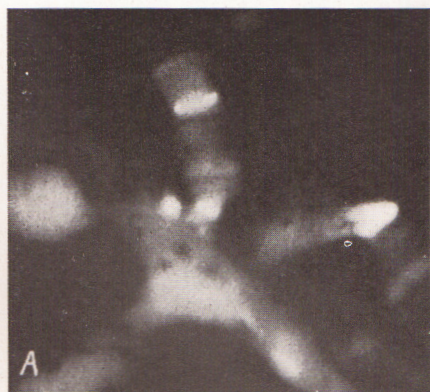


Рис. 2. А, Б — район хромоцентра у *D. melanogaster*. Интенсивная флуоресценция дисков 101F и 102D 4-й хромосомы (Б, Г) и диска 81F RIII хромосомы (Д, Е)

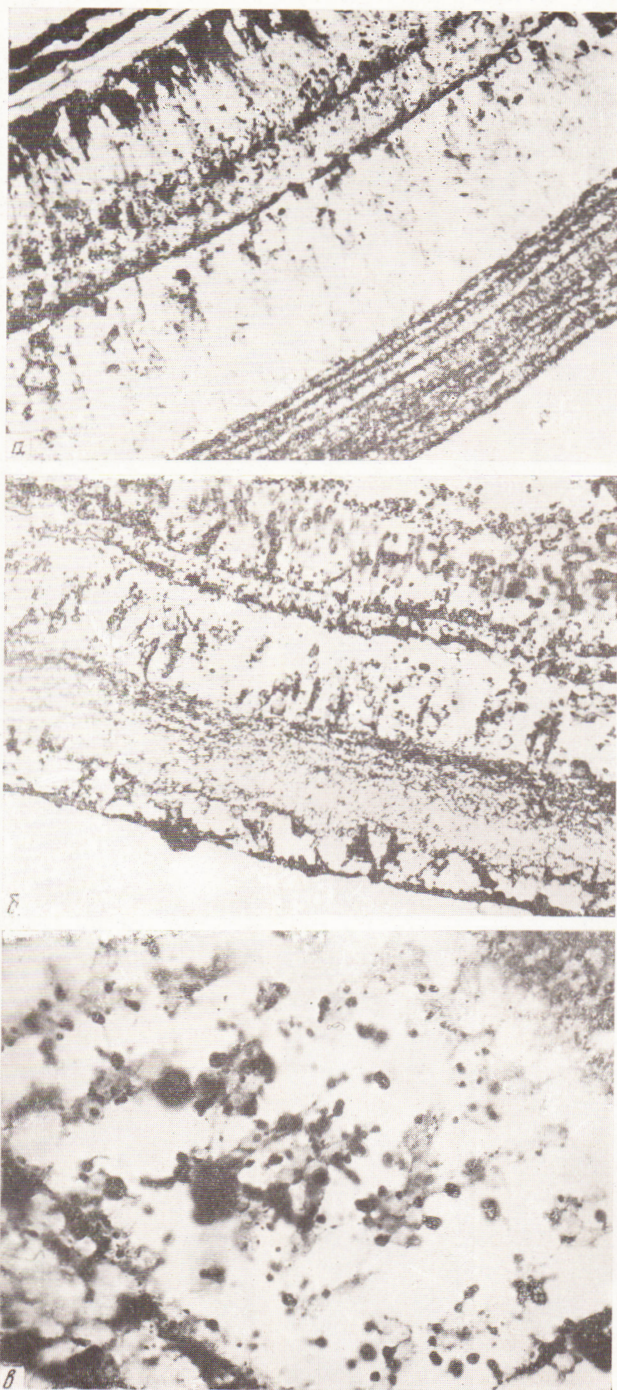


Рис. 1. Структурная организация сетчатки выявлена реакцией на гликоген по методу А. Л. Шабадаша без всякой дополнительной окраски. *а* — гликоген в темно-адаптированной сетчатке лягушки; слой пигментных клеток и фоторецепторов в верхнем левом углу; внизу — внутренний синаптический слой; 400 X. *б* — распределение гликогена в сетчатке после 10 мин. освещения рассеянным дневным светом; 400 X. *в* — деталь (повернута на 90°) 1б: слой биполяров с гипертрофированными накоплениями гликогена в синаптических терминалях и отростках мюллеровских клеток. 900 X