

УДК 576.312.3.575.1

ГЕНЕТИКА

Л. Я. ЛЕВИНА

КОРРЕЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОГО ОКРАШИВАНИЯ ЛОКУСА ХРОСОМОМЫ И ЕГО ГЕНЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

(Представлено академиком Н. П. Дубининым 7 VII 1975)

Впервые предложенная в лаборатории Касперсона (1968 г.) методика флюорохромирования хромосом растений, животных и человека получила в настоящее время широкое распространение. Теперь известно, что рисунок распределения ярко и темно окрашенных районов является строго специфичным для каждой хромосомы.

Первоначальное объяснение природы дифференциальной окраски флюорохромом сводилось к химической гетерогенности ДНК, наличию в составе ДНК участков, различающихся по повторяемости последовательностей нуклеотидов и по соотношению А — Т- и Г — Ц-пар оснований ДНК (¹⁻⁴).

Однако впоследствии стали накапливаться данные, показывающие, что это не единственная и, возможно, не главная причина дифференциального окрашивания. Так, ранее нами было показано (⁵), что у двух гомологов 4-й хромосомы наблюдаются различия в свечении одного и того же локуса, что трудно объяснить различиями в нуклеотидном составе ДНК.

В настоящее время следует считать, что дифференциальное окрашивание — это результат взаимодействия многих факторов и зависит от структурно-функциональной организации локуса. Взаимосвязь дифференциальной окрашиваемости и структурной гетерогенности хромосом нуклеотидного состава, последовательности и повторяемости нуклеотидов, структуры комплекса ДНК — белок, степени спирализации изучается всесторонне и постепенно стала проясняться (^{6, 7}). О функциональной организации локусов хромосом судили до сих пор, в основном, по времени репликации. Известно, что светящиеся области хромосом совпадают с позднореплицирующимися районами (^{3, 7, 9-11}). Хотя некоторыми исследователями высказывалась мысль о существовании корреляции между способностью хромосомных участков к дифференциальному окрашиванию и их генетической активностью, однако специального анализа этого вопроса в литературе нет.

Цель настоящей работы — изучить взаимосвязь дифференциальной окрашиваемости с генетической активностью гена.

Материалом исследования могут служить гетерозиготные транслокации 4-й хромосомы *Drosophila melanogaster* с эффектом положения гена *cubitus interruptus* (c.i.), полученные по методу Хвостовой — Гавриловой (1935 г.). Метод позволяет получить набор транслокаций, которые отличаются друг от друга по степени генетической активности нормального аллеля гена c.i. Показателем нормальной работы гена в этом объекте служит отсутствие разрыва кубитальной жилки в фенотипе мух, и, наоборот, инактивация

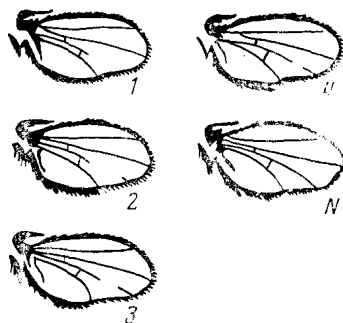


Рис. 1. Различная степень проявления признака c.i. по классам: N — с нормальной кубитальной жилкой; 1—4 — от полного отсутствия жилки до небольшого разрыва

гена сопровождается появлением разрыва кубитальной жилки. Обычно фенотипическое проявление признака мозаично. Условно его можно разделить на 4 класса (рис. 1). Для каждой транслокации модальное распределение по классам строго постоянно и сохраняется в ряду поколений⁽⁸⁾.

Получение транслокаций, цитологический и фенотипический анализ проводили как описано ранее^(5, 8). Были отобраны линии с одинаковым проявлением признака гена *s.i.* (табл. 1). Препараты для флюоресцентного

Таблица 1

Корреляция степени окрашиваемости локуса хромосомы с геном *s.i.* и фенотипического проявления признака этого гена

№ транс- локаций	Общее число хромосом	Общий вес площадей светящихся локусов, усл. ед.	Среднее значение веса площа- ди одного локуса	Общее число анализиро- ванных ♂, ♀	% наблюдаемых случаев от общего числа	
					1—2 классы	3—4 классы
20	33	1702	52±2,6	353	59,90	40,61
32	80	4106	51±2,5	319	62,06	37,94

анализа готовили как и в предыдущей работе⁽⁵⁾. Окрашенные 0,5% атебрином после буферного раствора pH 5,6 препараты анализировали в сине-фиолетовых лучах на люминесцентном микроскопе МИ-3, с возбуждающим фильтром ФС-1—2; СЗС-7—2; БС-8—2 и запирающим фильтром ЖС-18—2. Микрофотографии получены с пленки М-200, с выдержкой (15—20 сек), обработанной фенидогидрохиноновым проявителем, на фотобумаге № 7.

При визуальном наблюдении замечено, что у различных транслокаций варьируют размеры светящихся районов при одинаковой яркости свечения. В связи с этим оценка степени окрашиваемости локуса проводилась по размеру светящегося района. Анализ свечения выполнен по негативам. Контуры светящихся дисков, спроектированные через увеличитель при одном и том же увеличении, очерчивали, группируя на одном листе фотобумаги, вырезали и взвешивали.

Чтобы избежать ошибок, в анализе использовали только хромосомы личинок 3-й стадии, по возможности одинаковой ширины. Условия окрашивания, фотосъемки, фотообработки пленок были стандартными во всех вариантах. Анализировали только кадры, снятые с одинаковой выдержкой (17 сек.) в ограниченом интервале после начала просмотра (не позже 40 сек.). Хотя использование сканирующего устройства, по-видимому, дало бы более высокую точность измерения, но и описанный выше способ позволяет получить размеры светящихся районов с точностью порядка 5%.

Результаты табл. 1 показывают, что локус хромосомы с геном *s.i.* у обеих транслокаций имеет равные размеры и, следовательно, окрашивается одинаково. Хорошим подтверждением корреляции степени свечения с функциональным состоянием локуса послужило бы использование в анализе генетических линий дрозофилы с резко различной степенью проявления признака гена.

С этой целью были получены и отобраны транслокации с сильным эффектом — № 45, менее сильным — № 32 и очень слабым — № 40 (табл. 2). Результаты флюоресцентного анализа с оценкой размеров светящихся районов приведены в табл. 3. Можно видеть, что при сильном эффекте положения (45-я транслокация) обнаруживается наибольшее свечение в локусе с геном *s.i.* (рис. 2). При слабом эффекте (40-я транслокация) свечение не наблюдалось (рис. 3). Известно, что локус хромосомы с нормальным аллелем гена *s.i.* не обнаруживает свечения после окраски флюорохромом⁽⁵⁾. При ослаблении доминирования нормального гена в эффекте

положения наблюдается свечение локуса, которое тем сильнее, чем больше инактивация гена.

В настоящей работе дано прямое доказательство зависимости дифференциального окрашивания локуса хромосомы от его генетической активности.

Возможность маркировать locus нормального аллеля гена с.і. с помощью флюорохрома позволяет изучить дифференциальное окрашивание определенного гена. Вместе с тем возможность получить транслокации с

Таблица 2

Анализ фенотипического проявления эффекта положения гена с.і. в крыльях *D. melanogaster* в различных транслокациях (в %)

№ транслокаций	Сильный эффект		Слабый эффект		N	Общее число анализированных крыльев
	1	2	3	4		
45	40,8	29,5	11,0	9,5	9,2	338
32	36,0	30,0	11,0	13,0	10,0	422
40	4,0	16,0	30,9	21,1	28,0	357

Таблица 3

Оценка площадей свечения локуса хромосомы с геном с.і. в различных транслокациях *D. melanogaster*

№ транслокаций	Общее число анализированных хромосом	Общий вес площадей свечения локусов, усл. ед.	Среднее значение веса площади одного локуса
40	50	Свечение не наблюдалось	
32	69	3335	48,3±2,7
45	140	8268	59,0±2,9

эффектом положения дает объект для изучения генетической активности этого же гена. Сочетание этих двух факторов позволило четко показать, что инактивированный locus хромосомы с нормальным аллелем гена с.і. имеет яркое свечение, в то время как активизация работы гена сопровождается исчезновением окраски. Эти данные согласуются с имеющимися сведениями о том, что ярко светящиеся районы хромосом соответствуют плотно конденсированным и позднореплицирующимся участкам ДНК⁽⁶⁻⁷⁾, обогащенным, по-видимому, А—Т-парами нуклеотидов. Многочисленные данные показывают, что проявления яркого дифференциального окрашивания определенных локусов хромосомы, как в случае окраски Гимза, так и окраски флюорохромами, имеют одну и ту же природу.

Вместе с тем данные этой работы позволяют поставить вопрос о структурных особенностях локуса гена, участвующего в эффекте положения. На основе механизма задержанной репликации у эукариотов, по-видимому, может осуществляться генетическая инактивация отдельных районов ДНК хромосомы. Данные, полученные ранее^(5, 13), и результаты настоящей работы говорят в пользу этой гипотезы.

Институт общей генетики
Академии наук СССР
Москва

Поступило
7 VII 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ B. Weisblum, P. L. De Haseth, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., v. 69, 629 (1972).
² M. Blumenfeld, H. S. Forrest, ibid., v. 68, 3145 (1971). ³ J. R. Ellison, H. J. Barr, Chromosoma, v. 36, 375 (1972). ⁴ C. J. Bostok, S. Chrestie, Exp. Cell. Res., v. 86, 1, 157 (1974). ⁵ Л. Я. Левина, ДАН, т. 217, № 2, 458 (1974). ⁶ А. Ф. Захаров, А. И. Ибрагимов, В. С. Деминцева, Бюлл. эксп. биол. и мед., в. 7, 106 (1974). ⁷ Л. П. Тупицына, Канд. дисс. М., 1975. ⁸ Л. Я. Левина, Отчет ВИНТИ, № Б 315967, 1973. ⁹ E. Gannar, H. J. Evans, Chromosoma, v. 35, 3, 326 (1971). ¹⁰ W. Schnedl, Chromosoma, v. 38, 3, 319 (1972). ¹¹ D. Calderon, W. Schnedl, Humangenetik, v. 18, 1, 63 (1973). ¹² В. В. Хвостова, А. А. Гаприлова, Биол. журн., № 4, 5 (1935). ¹³ E. V. Ananiev, V. A. Grosdev, Chromosoma, v. 45, 2, 173 (1974).

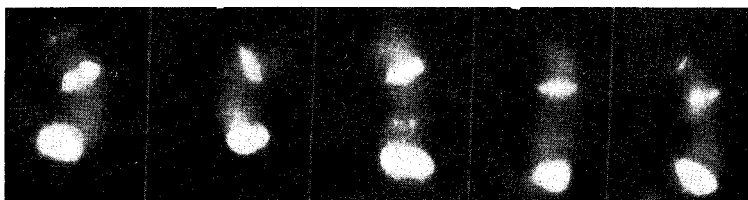


Рис. 2. Свечение локуса при сильной инактивации нормального аллеля гена *c.i.*

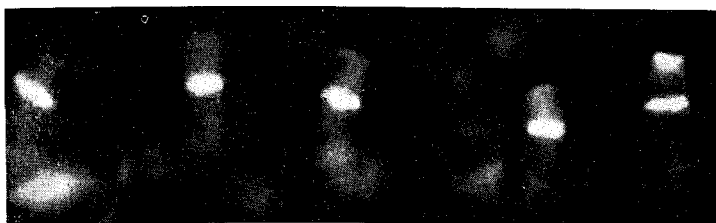


Рис. 3. Отсутствие свечения локуса при активизации работы нормального аллеля гена *c.i.*